



**УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ - ШТИП**

**ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ**

**Катедра за прехранбена технологија и преработка на анимални производи**

**ВЛИЈАНИЕ НА РАЗЛИЧНИ ТИПОВИ НА ФЕРМЕНТАТОРИ ВРЗ  
ПОЛИФЕНОЛНИОТ ПРОФИЛ НА ВИНА ОД СОРТИТЕ ВРАНЕЦ И МЕРЛО**

**Магистерски труд**

**Александар Пиперевски**

Штип, 2023

**Комисија за оценка и одбрана:**

**Ментор: проф. д-р Виолета Иванова-Петропулос, редовен професор  
Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип**

---

**Член: проф. д-р Виолета Димовска, редовен професор  
Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип**

---

**Член: проф. д-р Марина Стефова, редовен професор  
Природно-математички факултет, Универзитет „Св. Кирил  
и Методиј“-Скопје**

---

**Датум на одбрана: \_\_\_\_\_**

**Датум на промоција: \_\_\_\_\_**

## **Благодарност:**

Голема благодарност сакам да упатам на мојата менторка проф. д-р Виолета Иванова-Петропулос. Благодарам за пренесеното знаење, за новите искуства и за безусловната ангажираност во процесот на изработка на овој магистерски труд. Со нејзино посредување овој магистерски труд беше изработен со тримесечен престој на Институтот за биоанализи во Печ-Унгарија. Ви благодарам затоа што ме воведовте во светот на науката за вино, ми овозможивте престои во реномирани лаборатории во: Австрија, Бугарија, Романија и Унгарија. Под нејзино менторство учествував на четири домашни и две меѓународни конгреси на кои имав можност да ја презентирам мојата истражувачка работа. Се надевам дека во иднина заедно ќе ги оствариме планираните проекти и ќе ја продлабочиме нашата соработка.

Благодарност сакам да упатам и до целокупниот персонал на Институтот за биоанализи во Печ-Унгарија, за несебичната помош при изработката на експерименталниот дел од овој магистерски труд. Благодарност до проф. д-р Виктор Шандор за несебичното пренесено знаење во областа на ултрависокоефикасна течна хроматографија, проф. д-р Ференц Килар за професионалните научни совети и менаџирањето на целокупниот престој во Унгарија, проф. д-р Атила Фелингер за пренесеното теоретско знаење во областа на течната хроматографија.

Благодарност до раководството на винарската визба Имако Вино-Штип во која беше извршена подготовката на примероците вино. Се надевам дека добиените резултати од овој магистерски труд ќе најдат практична примена во производството на квалитетни и препознатливи вина на визбата.

Благодарност до моите колеги од работа Дејан Миланов и Атанас Рунчев за разбирањето во однос на моите подолги отсуства од работното место.

Благодарност до членовите на комисијата за одбрана проф. д-р Виолета Димовска и проф д-р Марина Стефова за насоките и коментарите кои ми ги дадоа при рецензијата на овој труд.

Благодарност до деканот на Земјоделскиот факултет при, Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип проф. д-р Емилија Арсов за моралната поддршка.

На крај најголема благодарност сакам да упатам на моите родители Никола и Снежана Пиперевски, кои заедно со мене ги поминуваа и добрите и лошите моменти. Благодарам за моралната, психолошката и финансиската поддршка која ми ја овозможија.

## ВЛИЈАНИЕ НА РАЗЛИЧНИ ТИПОВИ НА ФЕРМЕНТАТОРИ ВРЗ ПОЛИФЕНОЛНИОТ ПРОФИЛ НА ВИНА ОД СОРТИТЕ ВРАНЕЦ И МЕРЛО

### Краток извадок

Во овој магистерски труд беше определен полифенолниот профил на вина од сортите Вранец и Мерло (берба 2021). Вината од двете сорти беа произведени со примена на три методи на ферментација: класична метода, рото метода на ферментација и метода со потиснување (punchdown). Полифенолниот профил на примероците вино беше утврден со примена на ултрависокоефикасна течна хроматографија комбинирана со масен детектор со квадрупол и масен анализатор со време на прелетување (UPLC-QTOF-MS). Идентификацијата на соединенијата се засноваше на ретенционото време, и масените спектри, во споредба со достапните стандарди и податоци од литературата. Беа идентификувани и семиквантифицирани 54 соединенија поделени во неколку групи и тоа: фенолни киселини и нивни деривати, флавоноли, флаван-3-оли, дихидрофлавоноли стилбени, антоцијани и нивни деривати. Поединечни стандардни раствори на 9 фенолни соединенија (гална киселина, ферулна киселина, кафена киселина, *p*-кумарна киселина, 3,4-дихидроксибензоева киселина, рутин, кверцетин и *trans*-ресвератрол) беа подготвени и користени за конструирање на калибрациони криви, како и за квантификација на поединечните феноли. Беше направена валидација на методот и определени следните параметри: линеарност, прецизност, интрадневна и интердневна повторливост, граница на детекција (LOD) и граница на квантификација (LOQ). Имајќи го предвид влијанието на методата на ферментација, беше забележано дека со рото метода на ферментација се постигнува најдобра екстракција на фенолите и кај двете сорти на вино Вранец и Мерло. Со рото методата на ферментација, допирната површина помеѓу цврстите делови од грозјето (семки и луспи) со ширата е најголема, континуирана и неагресивна, а тоа резултира со најголема екстракција на фенолните компоненти од грозјето во виното.

**Клучни зборови:** Вино, полифеноли, UPLC-QTOF-MS, производство на вино, методи на ферментација.

# INFLUENCE OF DIFFERENT TYPES OF FERMENTORS ON THE POLYPHENOL PROFILE OF VRANEC AND MERLOT WINES

## Abstract

In this master thesis, the polyphenolic profile of wines from the Vranec and Merlot varieties (harvest 2021) was determined. The wines of both varieties were produced using three fermentation methods, namely: classic method, roto method and punchdown method. The polyphenolic profile of wine samples was determined using ultra performance liquid chromatography combined with a mass detector with a quadrupole and time-of-flight mass analyzer (UPLC-QTOF-MS). Compound identification was based on retention time, mass spectra, compared to available standards and literature data. 54 polyphenolic compounds were identified belonging to several groups: phenolic acids and derivatives, stilbens, flavonols, dihydroflavonols, flavan-3-ols, anthocyanins and their derivatives. Individual standard solutions of 9 phenolic compounds were prepared: gallic acid, ferulic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, rutin, quercetin and *trans*-resveratrol. These standards solutions were used to construct calibration curves as well as for the quantification of individual phenols. Method validation was performed by evaluation of the following parameters: linearity, precision (intra-day and inter-day repeatability), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). Considering the influence of the fermentation method, it was observed that the roto method gives the best results in the extraction of polyphenolic components in both Vranec and Merlot wine varieties. In the roto method of fermentation, the contact surface between the solid parts of the grapes (seeds and skins) with the must is the largest, continuous and non-aggressive, and this results in the greatest extraction of the phenolic components from the grapes into the wine.

**Keywords:** Wine, polyphenols, UPLC-QTOF-MS, wine production, fermentation methods

Објавени трудови коишто се резултатот на истражувањата во рамките на изработката на магистерскиот труд, објавени во:

- меѓународни списанија:

1. Piperevski, A., Ivanova-Petropulos, B., Milanov, D., Runchev, A. (2023). Influence of the type of fermenter on the chemical composition of Vranec and Merlot wines. *Journal of Agriculture and Plant Sciences*, **прифатен за објавување**.

- на научни манифестации:

1. **Piperevski A.**, Ivanova-Petropulos V., Sándor V., Kilár F. (2022). [Study of the phenolic profile of Vranec and Merlot wines produced under different vinification conditions](https://eprints.ugd.edu.mk/30108/). In: 20th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, 24-30 June 2022, Pecs, Hungary (**усна презентација**). <https://eprints.ugd.edu.mk/30108/>.
2. **Piperevski A.**, Ivanova-Petropulos V., Sándor V., Kilár F. (2022). [Phenolic profile of Merlot wines determined by UPLC-ESI-IT-MS](https://eprints.ugd.edu.mk/30243/). In: 15th Students' Congress of SCTM, 29 Sept - 1 Oct 2022, Institute of Chemistry, Skopje (**усна презентација**). <https://eprints.ugd.edu.mk/30243/>.
3. **Piperevski A.**, Ivanova-Petropulos V., Sándor V., Kilár F., Milanov D. (2022). [Идентификација на полифеноли во вина од сортата Вранец со примена на UPLC-ESI-IT-MS](https://eprints.ugd.edu.mk/30679/). In: III Студентска конференција „Критични прашања во земјоделството и животната средина“, 11 Nov 2022, Stip, Republic of North Macedonia. <https://eprints.ugd.edu.mk/30679/>.
4. **Piperevski A.**, Ivanova-Petropulos V., Sándor V., Kilár F., Milanov D. (2022). [Идентификација на полифеноли во вина од сортата Вранец со примена на UPLC-ESI-IT-MS](https://eprints.ugd.edu.mk/30679/). In: III Студентска конференција „Критични прашања во земјоделството и животната средина“, 11 Nov 2022, Stip, Republic of North Macedonia. <https://eprints.ugd.edu.mk/30679/>.
5. **Piperevski A.**, Ivanova-Petropulos V., Sándor V., Kilár F. (2022). Determination of polyphenolic profile of Pinot Noir wines with UPLC-ESI-IT-MS technique. In: XIII

Смотра на студентски трудови, 12 Dec 2022, Скопје.  
<https://eprints.ugd.edu.mk/31023/>.



## Содржина

<b>1. Вовед</b> .....	1
1.1. Сорти на грозје во Република С. Македонија.....	3
1.1.1. Карактеристики на сортата Вранец.....	5
1.1.2. Карактеристики на сортата Мерло.....	6
1.2. Хемиски состав на вино.....	7
1.3. Полифенолен состав на вино.....	10
1.3.1. Флавоноиди.....	11
1.3.2. Нефлавоноиди.....	20
1.4. Производство на црвено вино.....	23
1.5. Типови на ферментатори кои се користат во винската индустрија...	28
1.6. Течна хроматографија.....	32
1.7. Составни делови на течен хроматограф.....	34
1.8. Масена спектрометрија.....	40
1.9. Ултрависокоефикасна течна хроматографија (UPLC).....	43
<b>2. Цел на истражувањето</b> .....	47
<b>3. Методи на научноистражувачка работа</b> .....	49
3.1. Стандарди и реагенси.....	49
3.2. Грозје.....	49
3.3. Производство на вино од сортите Вранец и Мерло.....	50
3.4. Определување на основни параметри.....	52
3.4.1. Определување на алкохол, екстракт и специфична тежина...	52
3.4.2. Определување на вкупни киселини.....	53
3.4.3. Определување на испарливи киселини.....	54
3.4.4. Определување на слободен и вкупен SO <sub>2</sub> .....	55
3.4.5. Определување на редуцирачки шеќери.....	56
3.4.6. Определување на рН.....	58
3.5. Спектрофотометриски методи на анализа.....	58
3.5.1. Определување на вкупни феноли.....	59

3.5.2.	<i>Определување на вкупни антоцијани</i> .....	59
3.5.3.	<i>Определување на интензитет на боја и нијанса</i> .....	59
3.5.4.	<i>Определување на железо</i> .....	60
3.5.5.	<i>Определување на бакар</i> .....	61
3.6.	<i>UPLC-QTOF-MS анализа</i> .....	62
3.6.1.	<i>Валидациони параметри</i> .....	63
3.6.2.	<i>Статистичка анализа</i> .....	64
<b>4.</b>	<b>Резултати и дискусија</b> .....	<b>65</b>
4.1.	<i>Основни хемиски параметри на виното</i> .....	65
4.2.	<i>Резултати од спектрофотометриски анализи</i> .....	70
4.3.	<i>UPLC-QTOF-MS анализа на полифеноли во вина</i> .....	78
<b>5.</b>	<b>Заклучок</b> .....	<b>114</b>
<b>6.</b>	<b>Користена литература</b> .....	<b>115</b>

## 1. Вовед

На секоја приказна за виното треба да ѝ претходи некој убав збор, или некаква ода изразена во чест на овој пијалак. Францускиот поет Жак Превер одамна забележал дека „сите моди поминуваат, само виното останува“ (Johnson, 1989). Веројатно бил во право, бидејќи виното никогаш не било мода, туку исклучиво суштинска потреба на човекот. Виното навлегува во секуларниот и духовниот живот на луѓето. Познато е дека винската култура како дел од гастрономијата, може да биде показател за степенот на цивилизација на една нација, бидејќи старите Римјани велеле дека цивилизацијата достигнувала само до одгледување винова лоза и производство на вино. Според Италијанците, виното може да помогне и во запознавањето на една нација, бидејќи, како што велат „ако сакате да запознаете една нација, седнете на нивната маса и испијте го нивното вино“. Виното е најкултивираниот и најцивилизираното средство за уживање.

Има многу типови на вино со многу различни карактеристики, вистински рај за бескрајни гастрономски креации. Едни се пијат како аперитив, за да го подобрат апетитот, други се пијат со оброкот и се вградуваат и испреплетуваат со него како дијамант во прстенот, давајќи му на консуматорот возвишени гастрономски чувства, а постојат и вина кои се консумираат после оброкот како дигестиви.

Без сомнение докажано е дека виното има релаксирачки ефект врз човековото тело, и доколку се консумира умерено, овој пијалак му дава поттик на духот и ја зајакнува уметничката креативност кај човекот. Едноставно виното ја издигнува човековата душа на повисоко ниво, преку будење на чувства за сите вредности кои го облагодаруваат човечкиот живот. Такви се естетските вредности, музиката, поезијата, природната убавина и секако наклоноста и привлечноста кон спротивниот пол (Delin & Lee, 1992).

Виното има свои особености кои го издигнуваат далеку над сите познати пијалаци. Виното не е наследство на цивилизацијата, туку е пијалак што боговите му го дале на човекот. Виното со себе носи божествен знак и заедно со љубовта и поезијата, го прави светото тројство на земниот живот.

Историски гледано, првите записи за виното датираат од раниот антички период. Се смета дека првите лозја се насадени 6 000 години пред нашата ера во денешна Грузија и Ерменија. Планираното и систематско производство на вино се смета дека започнало во Месопотамија и Египет. За тоа сведочат бројните артефакти поврзани со производството на вино пронајдени во фараонските гробници (Allen & Fleming, 1961).

Како предмет на научен интерес виното се јавува во последните неколку векови. Направени се многу истражувања, експерименти, опсервации (Burton & Jacobsen, 2001). Сето тоа поткрепено со теоретското знаење во науката, придонело да се дојде до поголеми сознанија за исклучително комплексниот состав на виното, притоа успевајќи да се анализираат и компоненти застапени во виното во траги, како и да се проучат, претпостават и разберат многу биохемиски процеси кои се одвиваат во текот на производството на вино.

Во последните години направени се низа истражувања за бенефитите од конзумирањето на црвено вино врз кардиоваскуларниот систем (Weinbold, 1978; Baldwin & Hyams, 1987; Mukamal et al., 2006), како и влијанието врз некои видови на рак и тумори како и на некои други опасни болести на денешницата како што е Алцхајмеровата болест (Soleas et al., 1997). Голема предност на виното како пијалак, кој влијае на здравјето на луѓето, е тоа што сите компоненти во него се наоѓаат во растворена форма, достапна за метаболитичките процеси, за разлика од полифенолите кои се присутни кај растенијата во полимерна форма, тешко достапна за биохемиските процеси на организмите (Barbalán et al., 2003). Виното во себе содржи и голема количина полифенолни соединенија кои се одговорни за бојата на виното. Полифенолните соединенија играат важна улога како антиоксиданти и имаат низа полезни дејства врз здравјето на луѓето. Некои од полифенолните компоненти како што се антоцијаните, флавонолите и стилбените имаат важна улога во некои психолошки процеси кај човекот како резултат на нивната антиоксидантна и антиинфламаторна природа (Delin & Lee, 1992; Baum-Baicker, 1985; Kinsella et al., 1993).

Пошироко гледано, квалитетот на виното често се дефинира на различни начини. Може да биде оценет во однос на суптилноста и комплексноста,

потенцијалот на стареење, стилската чистота, сортната експресивност, рангирањето од експерти дегустатори или прифаќањето од консуматорите, при тоа секој има оправданост и ограничување. Сепак, најголемо влијание во развојот на винарството имаат експертите дегустатори, кои се насочуваат кон премиум вината, кои иако учествуваат со мал процент во светското производство, сепак го диктираат правецот во кој се движат лозарските и енолошките истражувања и развој на винарството во целост (Pettigrew & Charters , 2006).

### **1.1. Сорти на грозје во Република С. Македонија**

Успешноста на лозарството и винарството во Република Македонија е условено од постоењето на поволни агроеколошки услови, кои овозможуваат непречено и квалитетно одгледување на голем број сорти, како вински така и трпезни сорти на грозје (Димовска, 2009). Според климатските карактеристики и класификација на ЕУ, Република С. Македонија се смета како III-C-b зона за одгледување винова лоза. Во Република Северна Македонија постои еден лозарски реон кој се совпаѓа со целата територија на Република С. Македонија. Името на географската област- на реонот е Македонија. Основна карактеристика на оваа зона е дека вината може да имаат ацидификација, но не да се збогатуваат, што кореспондира со законодавството и сегашната пракса на производство на вино во земјата. Белите вина се карактеризираат со слаба киселост, живост и немаат карактеристики на „terroir“ додека црвените вина се воглавно со темна рубин-црвена боја, со мирис на црвено и шумско овошје и полна структура. Основното производство е лоцирано по течението на реката Вардар со следниве виногорја: Скопско, Велешко, Тиквешко и Гевгелиско-Валандовско Виногорје кое опфаќа околу 83% од вкупното производство на грозје и вино. Останати виногорја во кои се врши производство на грозје и вино со околу 17%.

Во реонот Македонија има 16 под-региони (виногорја) и тоа: Скопско Виногорје, Велешко Виногорје, Тиквешко Виногорје, Гевгелиско-Валандовско Виногорје, Струмичко-Радовишко Виногорје, Овчеполско Виногорје, Прилепско Виногорје, Битолско Виногорје, Преспанско Виногорје, Охридско Виногорје, Кичевско виногорје, Тетовско Виногорје, Кумановско Виногорје, Кратовско Виногорје, Кочанско Виногорје и Пијанечко Виногорје. Сите тие се карактеризираат со различни производствени услови и различен интензитет на производство. Имено, Тиквешкото Виногорје е област на која отпаѓа најголемиот дел од производството на грозје и вино во Република Северна Македонија (околу 30%). По него, следат Гевгелиско-Валандовското Виногорје, Струмичко-Радовишкото Виногорје итн.

Во Македонија се одгледуваат голем број интернационални и регионални сорти, од кои автохтона сорта е Станушина. Од белите сорти на грозје се одгледуваат: Белан, Бургундец бел, Бургундец сив, Жилавка, Жупљанка, Шардоне, Фиано, Кадарка бела, Карињан, Малвазија ароматична, Мускат Отонел, Охридско бело, Пловдина, Рајнски Ризлинг, Ризлинг Италијански, Ркацители, Совињон бел, Семијон, Смедеревка, Темјаника и Шардоне. Од црвените сорти застапени се: Бургундец црн, Вранец, Гаме бојадисер, Гаме црн, Гренаш црн, Каберне Франк, Каберне Совињон, Кратошија Франковка, Мерло, Монтепулчијано, Мускат Хамбург, Небиоло, Охридско црно, Плавец мал, Прокупец, Рефошко, Санџовезе, Сирах и Темпранило.

Во овој магистерски труд беа произведени вина од сортите Вранец и Мерло и затоа подетално ќе бидат опишани општите карактеристики на овие сорти на грозје.

### **1.1.1. Карактеристики на сортата Вранец**

Вранец е црногорска автохтона сорта, која настанала веројатно по пат на природно вкрстување. Кај нас е водечка сорта за производство на црвени вина и го карактеризира типот на македонските црвени вина. Оваа сорта зрее во втората декада на септември и најдобри резултати дава на средно плодни и умерено влажни почви. На суша е средно издржлива и затоа треба да се избегнуваат слаби и суви почви. Сортата Вранец е средно отпорна на пламеница, а е поотпорна на пепелница и сиво гниење. Оваа сорта на ниски зимски температури е чувствителна и затоа треба да се внимава при изборот на микролокациите. Тоа е сорта на топла клима која не дава добри резултати во посеверни и поснежни реони. На слика 1 даден е изгледот на грозд од сортата Вранец (Божиновиќ, 2005).

Коефициентот на родноста на лозата е 1,3-1,6, а просечната маса на гроздот е од 150 до 250 g. Ширата добиена од ова грозје содржи од 210 до 230 g/L шеќер и 6-6,5 g/L вкупни киселини. Вината се темно црвено обоени, полни на вкус, богати со обоени материи и екстракт и имаат карактеристичен мирис на зрела вишна и шумско овошје. Оваа сорта на грозје обезбедува суровина за производство на квалитетни и врвни вина и е многу значајна поради редовните и високи приноси.



Слика 1. Грозд од сортата Вранец

Figure 1. Vranec grape variety

### **1.1.2. Карактеристики на сортата Мерло**

Сортата Мерло е една од омилените сорти кои ја користат винарските визби за производство на квалитетно вино (Божиновиќ, 2005). Оваа сорта расте во енергична грмушка, со лози со умерена должина. Има морфолошки и функционално хермафродитни цветови, редовно и добро се оплодува. Гроздовите се со средна големина, со пирамидална или пирамидално-валчеста форма, со 1-2 крилца и тежина од околу 150 g. Зрната се мали, валчести, темно сино обоени со жилава и средно дебела покожица. Месестиот дел е цврст, безбоен и со специфичен сортен вкус. Грозјето има голем број на предности што го прави доста популарно за производство на вино. Главните предности на сортата Мерло се брзото зреење, акумулација на шеќери до месец октомври, лесно толерира суша и мраз и не е екстремно подложна на болести. Вината произведени од оваа сорта на



грозје имаат богат букет, пријатни ароми на слива, цреси и боровинки, со примеси на какао и црн бибер. На слика 2 даден е изгледот на грозд од сортата Мерло.



Слика 2. Грозје од сортата Мерло

Figure 2. Merlot grape variety

## 1.2. Хемиски состав на вино

### ***Вода***

Виното претставува комплексна смеса која содржи голем број соединенија, како што се јаглехидрати, ароматични соединенија, органски киселини, алкохоли, полифеноли, минерали, протеини, витамини (Wirdig & Woller, 1989). Главната хемиска компонента во виното е *водата*. Водата се однесува како растворувач на голем број соединенија во виното, а игра и значајна улога во хемиските реакции кои се случуваат во процесите на ферментација и стареење на виното.

### ***Алкохоли***

*Етил алкохол* е втората важна компонента и главен краен продукт на алкохолната ферментација. Тој се формира од моносахаридите глюкоза и фруктоза

кои се присутни во грозјето, под дејство на квасците, според следната равенка на реакција:



Потребни се 18 g/L шеќер за да се создаде 1 % етанол во текот на алкохолната ферментација. Тоа значи дека од грозје што содржи 180, 226 и 288 g/L шеќер, ќе се произведат вина со 10, 12,6 и 16 % етанол. Квасецот може да дејствува до 16 % етанол, додека при повисоки содржини на алкохол неговото дејство се прекинува. Некои вина можат да содржат и повисоки содржини на алкохол, кој, во тој случај, потекнува од дополнително додавање на етанол во виното (Bakker & Timberlake, 1993).

Покрај етил алкохол, во виното се формира и метил алкохол. Тој е присутен во мали концентрации и најчесто не влијае на сензорните карактеристики на виното. Метанолот е токсичен за живите организми, и за човекот, поради тоа што се метаболизира до формалдехид и мравска киселина (Sponholz, 1988). Настанува како резултат на кинење на врските во пектините кои содржат метил групи. Сепак, концентрациите на метанол во вино се ниски и се движат во граници од 0,1 - 0,3 g/L. Максимално дозволената граница на метанол во вино е 0,5 g/L (Amerine & Ough, 1980).

Кај виното се присутни и виши алкохоли, од кои најзастапени се: 1-пропанол, 2-метил-1-пропанол (изобутил алкохол), фенилетанол, и др. Формирањето на вишите алкохоли за време на ферментацијата зависи од користените винарски техники и технолошки постапки за производство на вино како што се температурата на ферментација, квасците, присуството на кислород, pH, присуство на азотни материи и др. (Fleet, 2003).

### ***Јаглехидрати***

Јаглехидратите се група на соединенија коишто содржат неколку хидроксилни групи, како и алдехидна или кето група. Најзастапени јаглехидрати во грозјето се глюкоза и фруктоза. Во полна зрелост на грозјето, тие се присутни во еднаква содржина. Во текот на ферментацијата, под дејство на квасците, од овие

јаглехидрати се создава етил алкохол и јаглерод диоксид, а реакцијата е проследена со ослободување на топлина. Во текот на алкохолната ферментација, јаглехидратите целосно преминуваат во етанол, но сепак, мало количество останува во виното (околу 2 g/L) (резидуален или остаточен шеќер). Резидуалниот шеќер е резултат на пентозите арабиноза и ксилоза, кои не учествуваат во процесот на ферментација и трансформација во алкохол (Dittrich & Barth, 1992).

### ***Минерални материји***

Минералните материји се присутни во грозјето и виното и најчесто потекнуваат од растворените минерали во почвата од која се храни лозата, потоа од технолошките постапки, енолошките средства, како и средствата за заштита на растенијата. Од нив, бакарот и железото присутни во поголема концентрација можат да предизвикаат заматување на виното и формирање на талог како резултат на создавање на оксиди на овие елементи, кои се нерастворливи во вода и алкохол (CuO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Cu и Fe обично потекнуваат од средствата за заштита на лозата, но може да потекнуваат и од опремата која се користи во визбата. Зголемена концентрација на Ca во виното може да предизвика формирање на кристали од калциум тартарат кои се таложат на дното од готовиот производ. Во вино присутни се и други метали, т.н. макроелементи, како што се Ca, Mg, Zn, Mn, Na, Na и K. Содржината на тешките и токсични метали, како Pb и Cd, треба да се контролира поради безбедносни причини и од здравствен аспект на консументите. Освен тоа, во вино се присутни и голем број на анјони како хлориди, сулфати, фосфати, нитрати. Нивното потекло главно е од минералните ѓубрива кои се користат за потхранување на лозата како и од инсектицидите и хербицидите кои се користат за заштита на лозата (von Hellmuth et al., 1985).

### ***Ароми***

Аромата во виното е термин што се користи за да се опише мирисот на виното и претставува баланс помеѓу стотина испарливи соединенија (Иванова, 2013). Најзастапени ароматични соединенија се естрите и вишите алкохоли, но присутни се и други испарливи соединенија, како што се: испарливи феноли,

лактони, терпени, алдехиди, кетони, масни киселини и др. Естрите имаат најчесто овошни ароми и значително влијаат на мирисот на виното. Цветни ароми даваат монотерпените, додека мирисите на црна рибизла потекнуваат од меркаптаните.

### ***Органски киселини***

Органските киселини се важни компоненти кои значително влијаат на хемискиот состав, микробиолошката стабилност и на целокупниот квалитет на виното. Доминантна органска киселина е винската (тартаратната) киселина. Други органски киселини се лимонска, килибарна, оцетна, млечна и пирогроздова (Singleton, 1987). Овие киселини влијаат на рН на виното, но и на неговите органолептички карактеристики. Киселоста на виното е поделена на два дела: испарлива и вкупна киселост. Испарливата киселост ја одредуваат испарливите киселини како што се оцетна киселина (која е доминантна и преку неа се изразува испарливата киселост на вината), мравска и пропионска киселина. Вкупната киселост ја дефинираат испарливите киселини и неиспарливите киселини, како што се винска, лимонска, јаболкова (Spayd & Andersen, 1996).

### **1.3. Полифенолен состав на виното**

Полифенолите се голема и комплексна група на соединенија кои имаат исклучителна важност за квалитетот на црвеното вино. Фенолите имаат значајна улога и влијание врз бојата, телото, мирисот и антимикробните својства на виното. Поради нивните антиоксидантни, антивирусни и антиканцерогени карактеристики, тие се од голема важност за здравјето на луѓето (Scalbert, 1991; Ivanova et al, 2011,). Фенолите се бензенови соединенија кои поседуваат една или повеќе хидроксилни групи директно поврзани во прстенот. Главните фенолни соединенија кои ги има во виното се поделени во две групи и тоа: флавоноиди и нефлавоноиди (Иванова, 2014).

Во групата на **флавоноиди** припаѓаат:

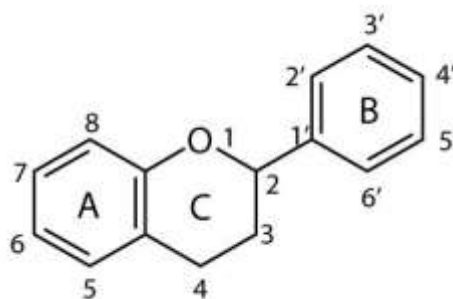
- Антоцијани
- Флаван-3-оли (мономери и полимери)
- Флавоноли
- Дихидрофлавоноли

Во групата на **нефлавоноиди** припаѓаат:

- Хидроксibenзоеви киселини и нивни деривати
- Хидроксициметни киселини и нивни деривати
- Стилбени

### 1.3.1. Флавоноиди

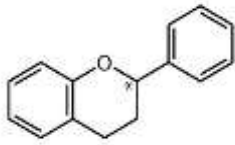
Флавоноидите постојат во слободна форма или се полимеризирани со други флавоноиди, шеќери, нефлавоноиди или можна е комбинација на овие компоненти со примарните нефлавоноиди, како што се дериватите на хидроксициметни киселини, и обично естерифицирани со шеќери, органски киселини или различни алкохоли (Иванова, 2014). Флавоноидите се карактеризираат со C6-C3-C6 скелет кој содржи два фенолни прстени (A и B) поврзани со централен пиранов прстен (C). На слика 3 е даден шематскиот приказ на структурата на флавоноидите.



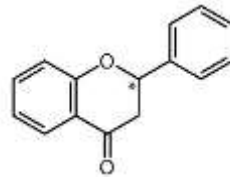
Слика 3. Хемиска структура на флавоноиди

Picture 3. Chemical structure of flavonoids

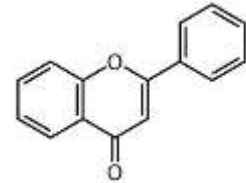
Флавоноидите може да се поделат во следните групи:



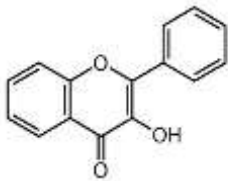
**Флавани**



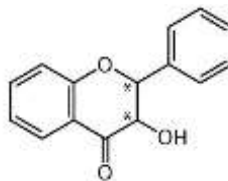
**Флаванони**



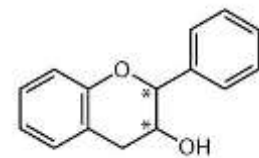
**Флавони**



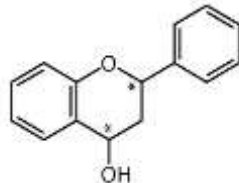
**Флавоноли**



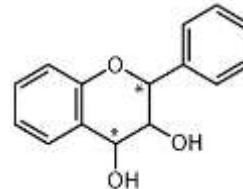
**Дихидрофлавоноли**



**Флаван-3-оли**



**Флаван-4-оли**

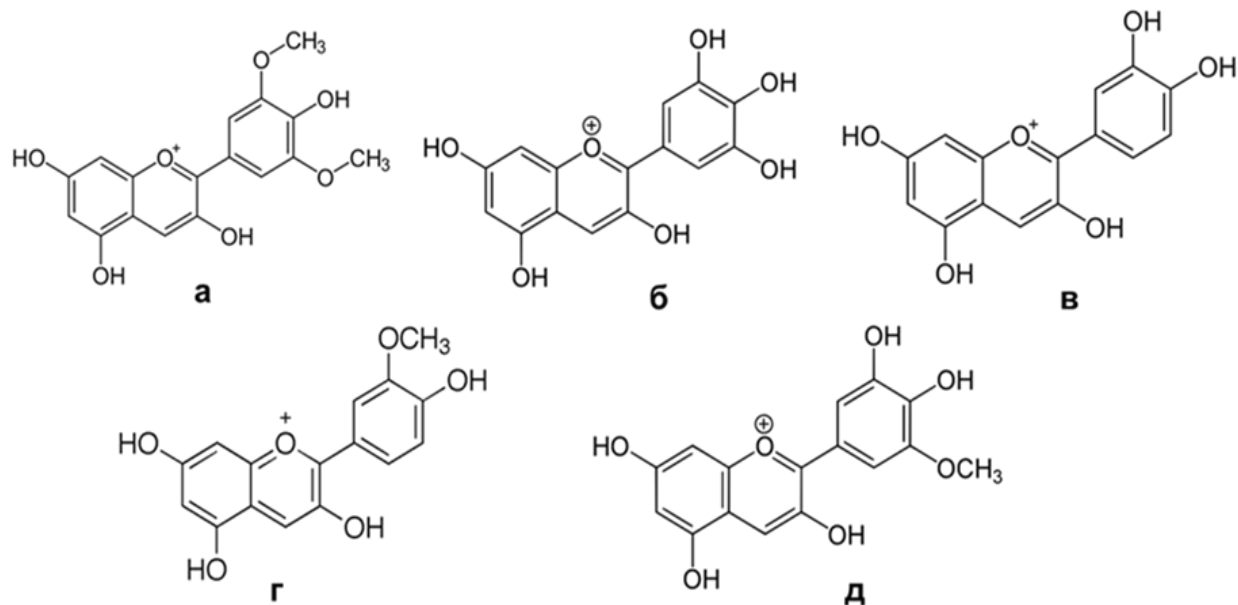


**Флаван-3,4-диоли**

### ***Антоцијани***

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. Класификацијата на антоцијаните се базира главно според положбата на хидроксилните и метокси групите на В прстенот од антоцијаните. Антоцијаните кои се присутни во грозјето и виното се базираат на пет основни антоцијанидини и тоа: делфинидин, цијанидин, петунидин, пејонидин и малвидин. На слика 4 се дадени структурните формули на основните антоцијанидини. Најзастапен антоцијанидин во црвеното вино е малвидин - најцрвениот од сите антоцијанидини и тој главно е одговорен за црвената боја на виното. Најзастапени антоцијани се 3-О-моноглюкозидите, а во грозјето се присутни

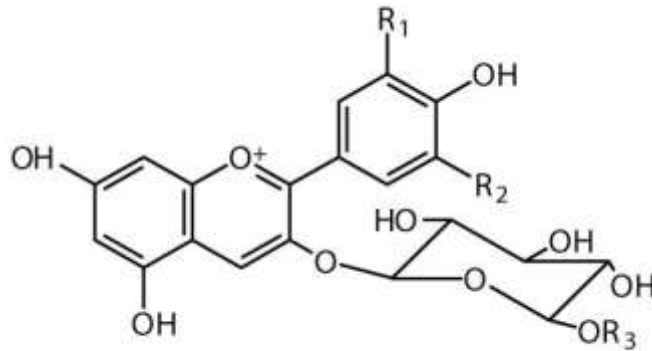
и 3-O–ацетилглукозиди, 3-O-кумароилглукозиди и 3-O-кафеоилглукозиди (Somers, 1971; Nagel & Wulf, 1978, Baldi et al., 1995; Ribereau-Gayon et al., 2006).



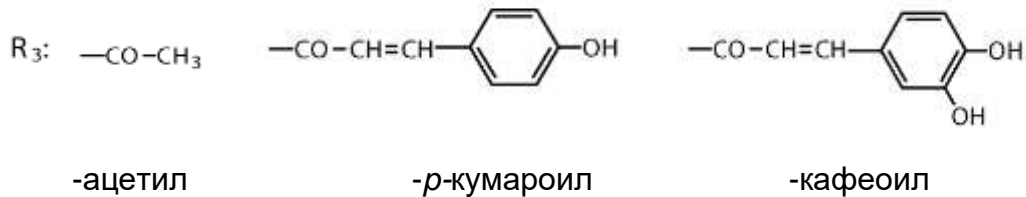
Слика 4. Структурни формули на основните антоцијанидини а) малвидин, б) делфинидин, в) цијанидин, г) пејонидин, д) петунидин

Figure 4. Structural formulas of the basic anthocyanidins a) malvidin, b) delphinidin, c) cyanidin, d) peonidin, e) petunidin

Антоцијаните во виното постојат во форма на глукозиди (врска на флавоноидниот дел (агликон) со шеќер). Врската се случува на C3 атомот, а шеќерот најчесто е глукоза. Глукозидното поврзување најчесто ја зголемува хемиската стабилност и растворливоста на антоцијанидините. Секој антоцијан потоа може да се ацилира со врзување на шеќерниот дел обично на C6 положба со оцетна, кумарна или кафтарна киселина. Структурата на антоцијани моноглукозиди е прикажана на слика 5.



Антоцијани 3-О-моноглукозиди	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Mr
Делфинидин 3-О-моноглукозид	ОН	ОН	465
Цијанидин 3-О-моноглукозид	ОН	Н	449
Петунидин 3-О-моноглукозид	OCH <sub>3</sub>	ОН	479
Пејонидин 3-О-моноглукозид	OCH <sub>3</sub>	Н	463
Малвидин 3-О-моноглукозид	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	493



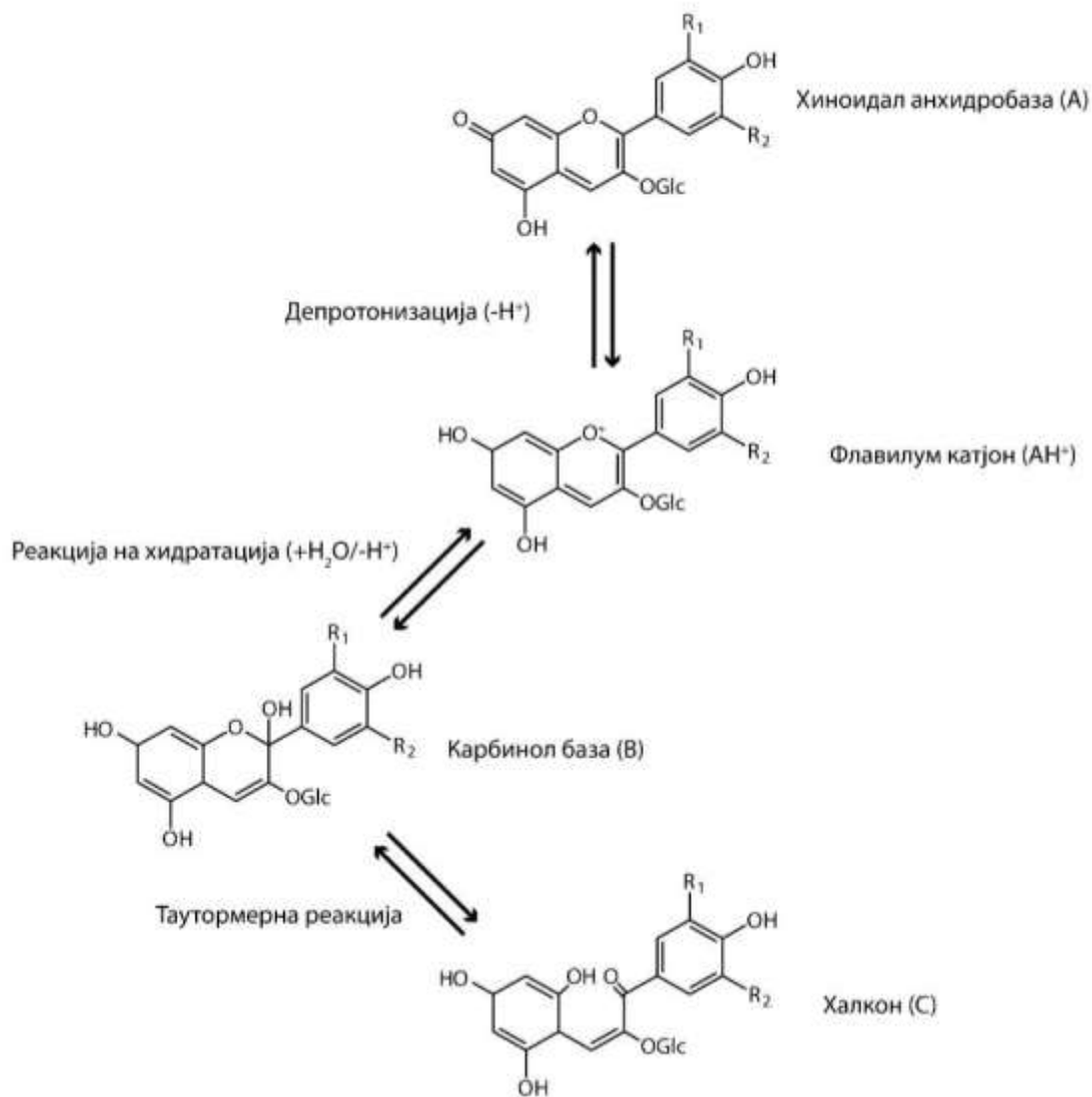
Слика 5. Структура на антоцијани 3-О-моноглукозиди

Picture 5. Structure of anthocyanins 3-O-monoglucosides

Антоцијаните екстахирани од грозјето ја даваат бојата на младите вина, но во текот на винификацијата и зреењето на вината, тие се модифицираат и се формираат стабилни пигменти преку реакции на винил фенолни деривати (Fulcrand et al., 1996), и пирогроздова киселина (Bakker & Timberlake, 1997; Fulcrand et al., 1998). Бројни олигомерни пигменти настануваат при реакции на кондензација на антоцијаните со ацеталдехид како и директни реакции со флаванолите (Иванова, 2014).



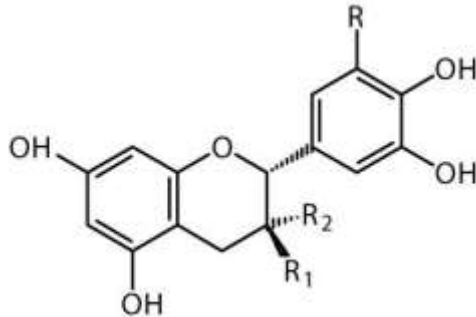
Бојата на антоцијаните директно е поврзана со рН на средината, при што во повеќе истражувања веќе е прикажано присуството на обоени и необоени форми на антоцијаните зависно од рН. Различни молекулски трансформации настануваат во антоцијанскиот состав при промена на рН. Така, во воден раствор во рамнотежа постојат неколку структури на антоцијани и тоа: флавилиум катјон (црвена боја), хиноидна база (виолетово – пурпурна боја), хемикетал(на) или карбинол(на) псевдо база (без боја) и халкон форма (жолта боја) (Иванова, 2014). Овие форми се прикажани на слика 6. Во силно кисела средина главно се присутни флавилиум црвените катјони, кои ја губат бојата со зголемување на рН преку формирање на безбојни карбинол бази како резултат на адиција на вода и губење на протон, кои пак се во рамнотежа со жолтите халкон форми со отворен прстен. Рамнотежата помеѓу карбинол и халкон формите бавно се воспоставува на собна температура и во слабо кисела средина, а при зголемена температура рамнотежата се поместува кон халкон формите. Во неутрална и алкална средина, флавилиум формата се депротонира при што рамнотежата се поместува кон пурпурните хиноидни бази (Иванова, 2014).



Слика 6. Трансформации на антоцијаните во зависност од рН на средината  
 Figure 6. Transformations of anthocyanins depending on the pH of the medium

### Флаван-3-оли

Флаванолите, кои најчесто се нарекуваат флаван-3-оли, се полифенолни соединенија хидроксилирани во положба 3 и се сретнуваат како мономери, но и како олигомери и полимери (Иванова, 2014). Главните мономерни флаван-3-оли во грозје и вино се (+)-катехин и (-)-епикатехин. Структурната формула на флаван-3-ол мономерите е прикажана на слика 7.



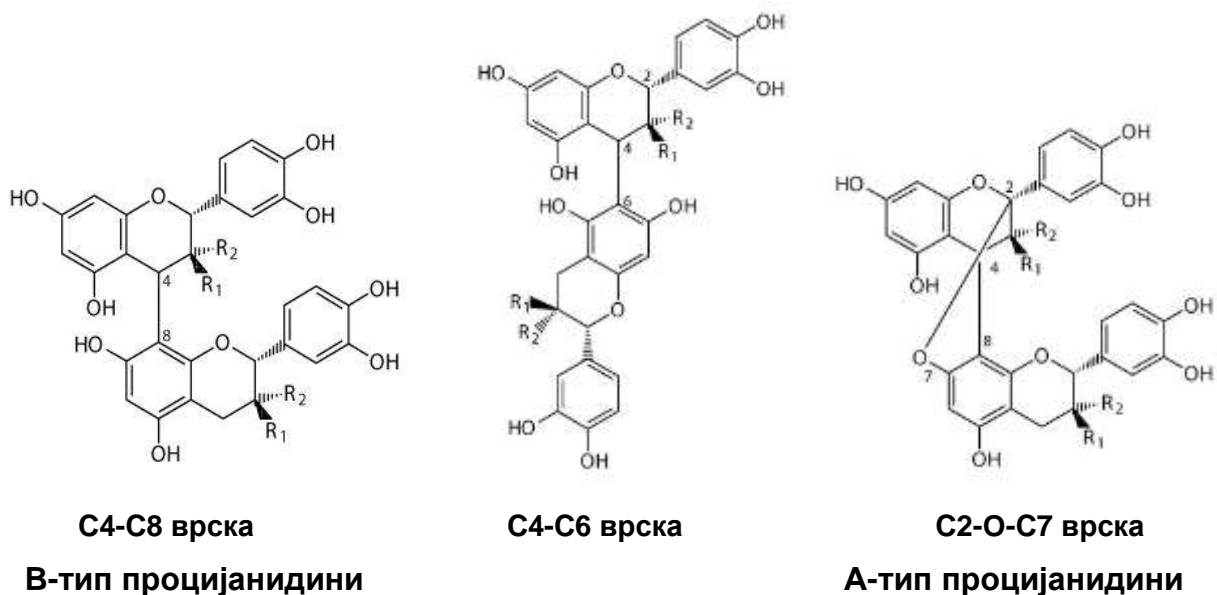
Флаван-3-оли	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	M <sub>r</sub>
(+)-Катехин	H	ОН	H	290
(-)-Епикатехин	H	H	ОН	290
(+)-Галокатехин	ОН	ОН	H	306
(-)-Епигалокатехин	ОН	H	ОН	306
(-)-Епикатехин-3-О-галат	H	H	ОГалат	442

Слика 7. Структура на флаван-3-ол мономери

Figure 7. Structure of flavan-3-ol monomers

Во грозјето, полимеризацијата на катехин (флаван-3-ол) создава класа на полимери наречени процијанидини. Процијанидините може да се класифицираат врз основа на нивните флавоноидни мономери, врзувањето, естерификацијата или функционалните својства. Најчесто ковалентната врска се остварува меѓу C4 атомот на пирановиот прстен со горниот флавоноид и C8 атомот на A прстенот од долниот флавоноид. На тој начин се формираат B тип на процијанидини. Процијанидините димери B1 и B4 се разликуваат само по поставеноста на првите и последните епикатехински и катехински единици.

Голем борј В-тип процијанидини димери и тримери (флаванолните единици се поврзани преку C4-C8 и/или C4-C6 врски) се детектирани во грозје (Da Silva et al., 1991). А-тип процијанидините содржат двојни врски со C2-O-C7 или C2-O-C5. Во зависност од природата на антоцијанидините кои се ослободуваат, постојат неколку групи на процијанидини. На слика 8 се прикажани структурите на процијанидин димерите идентификувани во грозје и вино.



Слика 8. Структура на флаван-3-ол димери

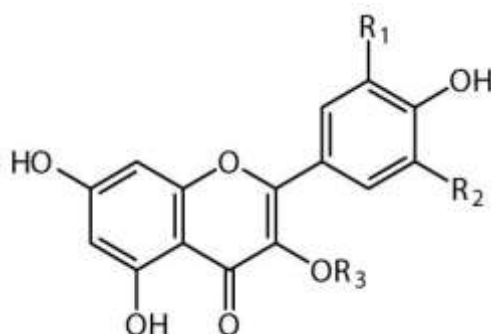
Figure 8. Structure of flavan-3-ol dimers

Флаванол олигомерите и полимерите се нарекуваат кондензирани танини или проантоцијанидини (Bate-Smith, 1954). Кога танините се загреваат во кисела средина, тие ослободуваат црвени антоцијанидин пигменти како резултат на кисело-катализирано раскинување во оксидациони услови.

### **Флавоноли**

Флавонолите се лоцирани во вакуолите од лушпите на епидермот и хиподермот и заедно со антоцијаните од црвеното грозје апсорбираат ултравиолетова светлина, заштитувајќи ги внатрешните ткива од негативните ефекти на UV радијацијата. Најзастапени флавоноли во црвените сорти на грозје

се главно 3-глукозидите на мирицетин, кверцетин, кемферол и изорамнетин (Ribereau-Gayon, 1964). На слика 9 дадена е структурата на флавонолите.



Флавоноли	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	M <sub>r</sub>
Мирицетин	ОН	ОН	ОН	318
Мирицетин-3-глукозид	ОН	ОН	Глукозид	480
Мирицетин-3-глукуронид	ОН	ОН	Глукуронид	494
Кварцетин	ОН	Н	Н	302
Кварцетин-3-глукозид	ОН	Н	Глукозид	464
Кварцетин-3-глукуронид	ОН	Н	Глукуронид	478
Камферол	Н	Н	Н	286
Ларицитрин-3-глукозид	ОСН <sub>3</sub>	ОН	Глукозид	494
Сирингетин-3-глукозид	ОСН <sub>3</sub>	ОСН <sub>3</sub>	Глукозид	508
Изорамнетин	ОСН <sub>3</sub>	Н	Н	316
Изорамнетин-3-глукозид	ОСН <sub>3</sub>	Н	Глукозид	498

Слика 9. Структура на флавоноли

Figure 9. Structure of flavonols

### **Пираноантоцијанидини**

Пираноантоцијанидините се формираат како резултат на реакција помеѓу антоцијаните со различни молекули, како што се винилфенолни деривати, ацеталдехид или пирогроздова киселина (Иванова, 2014). Пираноантоцијанидините

кои се добиваат при реакција на антоцијани со пирогроздова киселина се нарекуваат карбокси-пирано-антоцијани. Реакцијата на кондензација на антоцијаните со флавоноидите се одвива бавно. Сепак, врзувањето е забрзано во присуство на ацеталдехид (Bakker et al., 1993). При ниска вредност на рН, ацеталдехидот постои во форма на карбониум јон. Во оваа карбониум форма, може да реагира со нуклеофилен (негативно наелектризиран) C8 атом од терминалниот дел на процијанидинот. При тоа, преку реакција на дехидратација се врши претворање на безбојниот хемикетал во обоен флавилиум (црвен) или киноидал (виолетов) јон, со што се постигнува зајакнување на бојата на виното. Алдехиди како што се, пропаналдехид, изобутилалдехид и бензалдехид, можат да ја играат улогата на ацеталдехид и можат да предизвикаат поврзување на антоцијаните со флаван-3-олите (Dixon & Xie, 2005).

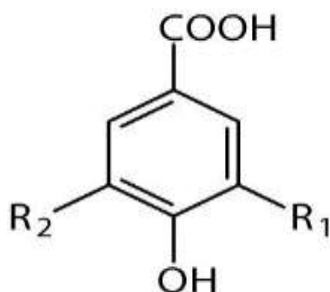
### **1.3.2. Нефлавоноиди**

Главни нефлавоноиди во виното и грозјето кои содржат еден ароматичен прстен се деривати на хидроксициметни и хидроксибензоеви киселини. Друга група на нефлавоноиди се стилбените и стилбен глюкозидите (Иванова, 2014).

#### ***Хидроксибензоеви киселини***

Хидроксибензоевите киселини се карактеризираат со C<sub>6</sub> – C<sub>1</sub> структура. Главни претставници на овие киселини се гална киселина, *p*-хидроксибензоева киселина, протокатехинска киселина, салицилна киселина, сирингитинска киселина и ванилна киселина.

Во грозјето, хидроксибензоевите киселини се застапени како естри или глюкозиди. Слободните форми во виното се јавуваат како резултат на раскинување на матрици како што се антоцијаните. Во виното галната киселина е застапена во најголема концентрација. Таа потекнува од грозјето, но може да се формира и со реакции на хидролиза на хидролизирачките и кондензираните танини. На слика 10 е прикажана структурата на хидроксибензоевите киселини (Иванова, 2014).



<b>Хидроксибензоеви киселини</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>M<sub>r</sub></b>
Гална киселина	ОН	ОН	170
<i>p</i> -Хидроксибензоева киселина	Н	Н	138
Протокатехинска киселина	ОН	Н	154
Сирингитинска киселина	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	198
Ванилна киселина	Н	OCH <sub>3</sub>	168

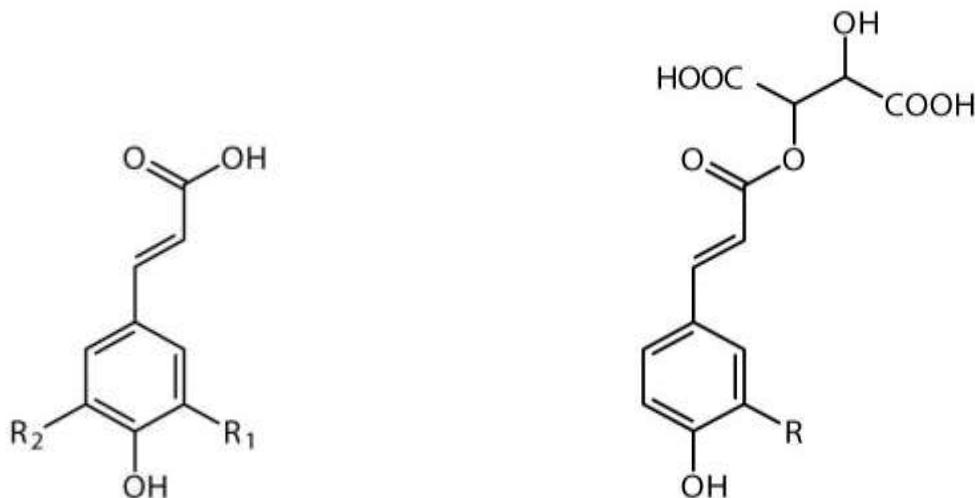
Слика 10. Структура на хидроксибензоеви киселини

Figure 10. Structure of hydroxybenzoic acids

### ***Хидроксициметни киселини***

Најзастапени хидроксициметни киселини во виното се: кафена киселина, *p*-кумарна киселина, ферулна киселина и синапинска киселина. Овие соединенија може да бидат присутни во *cis* и *trans* форми, но *trans* формите се постабилни и затоа нивното присуство во виното е доминантно (Иванова, 2014).

Хидроксициметните киселини во вино се присутни во мали концентрации како слободни киселини, и главно се присутни во врзана форма и тоа како естри на винска киселина, а може да бидат поврзани и со шеќери, алкохоли и други соединенија. Структурата на хидроксициметните киселини е дадена на слика 11.



### Хидроксициметни киселини

### Деривати на хидроксициметни киселини

Хидроксициметни киселини	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	M <sub>r</sub>
Кумарна киселина	H	H	164
Кафена киселина	OH	H	180
Ферулна киселина	OCH <sub>3</sub>	H	194
Синапинска киселина	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	224

Деривати на хидроксициметни киселини	R	M <sub>r</sub>
Кутарна киселина	H	296
Кафтарна киселина	OH	312
Фертална киселина	OCH <sub>3</sub>	326

Слика 11. Структура на хидроксициметни киселини и нивни деривати

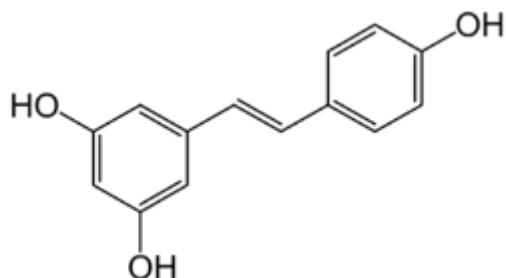
Figure 11. Structure of hydroxycinnamic acids and their derivatives

### Стилбени

Стилбените се нефлавоноиди кои се ситетизираат во виновата лоза како одбранбен механизам од фунгална инфекција како што е *Botrytis cinerea*. Најчесто тоа се случува под дејство на UV зрачење од сонцето. Најпознат стилбен присутен во виното е ресвератрол. Тој се јавува во две форми, *cis* и *trans*. Најчесто присутен



стилбен во виното е *trans*-ресвератрол (Иванова, 2014). Структурата на овој стилбен е претставен на слика 12.



Слика 12. Структурна формула на *trans*-ресвератрол

Figure 12. Structural formula of resveratrol

Ресвератрол има антиоксиданти и антиинфламаторни особини и игра важна улога во заштита од болести како што се рак, дијабетес и Алцхајмерова болест (Scalbert, 1991).

#### 1.4. Производство на црвено вино

Виното е производ што се добива со алкохолна ферментација на јаглехидратите присутни во грозјето, кои во текот на ферментацијата се разградуваат под дејство на квасецот и при тоа се добива етил алкохол и јаглород диоксид и се ослободува енергија. Производството на црвено вино вклучува неколку постапки:

- Берба на грозјето
- Гмечење и дробење на грозјето
- Алкохолна ферментација (додавање на сулфур диоксид, квасец и нутриенти за да започне алкохолната ферментација)
- Мацерација
- Додавање на ензими
- Ладна стабилизација
- Филтрирање
- Ставање на виното во шишиња

### ***Берба на грозјето***

Бербата на грозјето е еден од најважните процеси за лозарите и за винарските визби. Одредувањето на вистинското време за берба на грозјето се врши врз основа на изгледот, вкусот и анализа на грозјето (содржина на шеќер, рН и содржина на киселини). Со цел да се зачува свежината на грозјето, најдобро е бербата да се изведува во раните утрински часови кога температурата е ниска. Грозјето може да се собира рачно или машински (Ribereau-Gayon et al., 2006). Од голема важност за добивање на квалитетно вино е начинот на манипулација со грозјето после бербата. Овде важна улога имаат температурата, начинот на транспорт на грозјето како и хигиената на садовите и машините во кои се собира грозјето. Постојат примери кога заради несоодветно третирање на грозјето после бербата (покачена температура, физичко оштетување на зрната) од квалитетни сорти на грозје се добиваат вина со лош квалитет и голем број дефекти, како што се мирис на  $H_2S$ , оксидациони процеси при кои доаѓа до промена на бојата, итн.

### ***Гмечење и дробење на грозјето***

Откако грозјето ќе биде донесено во визбата, се пристапува кон негово гмечење и дробење и одделување од цврстите делови (дршките). За да се избегнат процесите на оксидација се додава сулфур диоксид.  $SO_2$  може да се додава како сол (калиум метаби сулфит) или во растворена форма (5 % раствор од сулфуреста киселина). Количината на додаден сулфур диоксид зависи здравствената состојба на грозјето. Кај здравото грозје се додава околу 0,3 mg/L  $SO_2$ , кај грозјето подложно на процес на гниење може да се додава и до 70 mg/L  $SO_2$  (Troost, 1998). Гмечењето на грозјето се постигнува на различни начини: најчесто се применува притискање врз перфориран сид или со поминување на грозјето преку валјаци (Boulton et al., 1996).

### **Алкохолна ферментација**

Откако ќе се додаде SO<sub>2</sub>, по околу 24 часа се пристапува кон инокулирање на гроздовата каша со квасец (*Saccharomyces cerevisiae*) за да започне алкохолната ферментација. Изборот на видот на квасецот зависи од сортата на грозје како и карактеристиките на виното кое производителот сака да ги добие. Пред да се инокулираат во ширата, квасците мора да се активираат. Активирањето се врши во топла вода на температура од 38 – 40 °C, за време од околу 20 минути. Оваа температура и времетраење на активација е доволна за рехидратација на квасецот (Kunkee & Bisson, 1993). Кај инокулираните ферментации обично се додава квасец во количина од околу 10<sup>5</sup> – 10<sup>6</sup> клетки/mL. Активните суви квасци најчесто содржат 20 – 30 x 10<sup>9</sup> клетки/g (Walker, 1989). Реакцијата на алкохолната ферментација може да се прикаже со следната равенка:



Покрај основните продукти на алкохолната ферментација (алкохол и CO<sub>2</sub>), во помали количества се создаваат и голем број други соединенија како што се глицерол, оцетна киселина, килибарна киселина, естри и др. При процесот на алкохолна ферментација се ослободува енергија во форма на топлина (егзотермна реакција).

Текот на алкохолната ферментација зависи од многу фактори како што се температурата на ферментацијата, светлината, pH на ширата, присуството на фенолни соединенија како и содржината на создадениот алкохол (Fleet, 2003, Divol et al., 2012, Mamolar-Domenech et al. 2023, Vion et al. 2023). Во индустриски размери сите овие параметри строго се контролираат со цел алкохолната ферментација да се одвива континуирано и ефикасно. Температурата е еден од важните фактори за почетокот на алкохолната ферментација како и за нејзиното времетраење. Така, доколку температурата е повисока од потребната, алкохолната ферментација започнува порано и трае пократко. Причината за тоа се квасците, кои се отпорни на ниски температури, но на повисоки температури може да дојде до нивно изумирање, што ќе доведе до прекинување на процесот на ферментација. Според

тоа, температурата на ферментацијата не смее да биде повисока од 32 °C (Carrasco et al., 2001).

Содржината на јаглехидрати во ширата влијае на текот на алкохолната ферментација. Ферментацијата најдобро се одвива доколку содржината на шеќери е во граници од 150 – 250 g/L. При ниски концентрации на шеќер, ферментацијата се одвива бавно, а при концентрации на шеќер поголеми од 250 g/L, ферментацијата се одвива отежнато и може да дојде до прекин, односно да остане неисферментиран шеќер. Високите концентрации на шеќер во ширата делуваат плазмолитички на клетките на квасецот и ја блокираат неговата функција (Fleet, 2003).

Киселоста на ширата исто така има влијание на текот на алкохолната ферментација. Оптималната вредност на вкупната киселост на ширата за нормално работење на квасецот е околу 5 g/L вкупни киселини. Фенолните компоненти немаат значително влијание врз процесот на алкохолна ферментација. Докажано е дека доколку концентрацијата на танински материи во текот на ферментацијата е поголема од 10 g/L, настанува блокирање на работата на квасецот, а со тоа и на текот на ферментацијата. Причина за ова е што позитивно наелектризираните фенолни соединенија се спојуваат со клетките на квасецот кои се спротивно наелектризирани и на тој начин настанува блокирање на функционирањето на квасецот (Bauer & Pretorius, 2000, Magliani et al., 1997).

### ***Мацерација***

Мацерација е време на контакт на цврстите делови на грозјето со ширата. При производство на бели вина, мацерацијата трае кратко, неколку минути до неколку часа, а за црвени вина, мацерацијата трае од 5 до 10 дена, зависно од типот на виното кое се произведува. Мацерацијата на црвеното грозје обично се одвива заедно со алкохолната ферментација.

### ***Додавање на ензими***

Ензими може да се додаваат на почетокот од производството, во текот на ферментацијата или по нејзино завршување. Најчесто се додаваат глуканази со



### ***Филтрирање на виното***

Филтрацијата на виното се врши низ порозни материјали низ кои не може да поминат микроорганизмите со цел стерилизирање на виното, односно отстранување на микроорганизмите кои можат да предизвикаат несакани последици на виното. Изборот на материјалот за филтрирање зависи од сортата на виното, неговиот турбидитет и содржината на штетни микроорганизми. По завршување на филтрацијата, виното е спремно за полнење во шише, што претставува и последна фаза од процесот на производство на вино (Ribeiro-Correa et al., 1996).

### ***Ставање на виното во шише***

По завршување на сите технолошки постапки и добивање на краен производ, виното се става во шишиња, најчесто стаклени, се пакува и се транспортира до потрошувачите. Важно е чувањето на шишињата да биде на соодветна температура и светлина за да се овозможи стабилност на вината.

## **1.5. Типови на ферментатори кои се користат во винската индустрија**

Садовите во кои се врши процесот на алкохолната ферментација се нарекуваат ферментатори. Ферментаторите имаат најразлични форми, големини и технички дизајни. Денешните ферментатори се направени од нер'госувачки материјал и имаат права цилиндрична форма или форма на превртен конус. Во овој магистерски труд се користени следните три типови на ферментатори кои имаат различни техничко-технолошки карактеристики:

### ***Класичен ферментатор***

Класичните ферментатори се направени од нер'госувачки материјал и имаат конусна форма. Ширата заедно со издробеното грозје и семките влегува во ферментаторот од горниот отвор. На долниот дел близу до конусот овие ферментатори содржат специјални мрежести структури наречени сита. За да се зголеми контактната површина помеѓу ширата и лушпите од зрната, а со тоа и да

се зголеми ефикасноста на екстракција на фенолите, овие ферментатори се снабдени со центрифугална пумпа. Со помош на оваа пумпа и систем од иноксни цевки ширата се носи од долниот дел и се испушта на врвот од капата формирана од семки и луспи на грозје и на тој начин се зголемува контактната површина меѓу ширата и цврстите делови. Секој ферментатор е снабден со компјутерска програма за вклучување на пумпата и циркулирање на течноста. Постојат и системи за регулирање на температурата преку циркулирање на вода во двојните ѕидови на ферментаторот. Единствен недостаток на овој тип на ферментатори е тоа што по завршувањето на ферментацијата, одделувањето на цврстиот од течниот дел најчесто се врши мануелно. Тоа значи дека течниот дел се прецедува преку ситото на кој остануваат лушпите и семките. Програмата зададена на овој тип на ферментатори за вината кои се предмет на овој магистерски труд, е вклучување на систем на циркулација 4 пати на ден во траење од 10 min. Изгледот на овој тип на ферментатор е даден на слика 13.



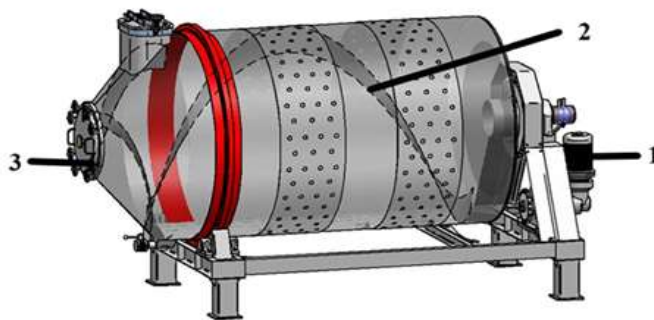
Слика 13. Класичен ферментатор. 1: формирана капа од цврстите делови на грозјето, 2: шира, 3: центрифугална пумпа, 4: распрскувач

Figure 12. Classic fermenter

1: formed cap of solid parts in the pulp, 2: pulp, 3: centrifugal pump, 4: sprayer

## ***Ротоферментатор***

Ротоферментаторите се целосно автоматизирани и прилагодени за производство на црвено вино. Тие се така конструирани за да може да се постигне максимална екстракција на бојата од црвеното грозје, најчесто преку топла мацерација. Овие ферментатори се најчесто поставени во хоризонтална положба и се прикачени на два рото мотори. Во внатрешноста имаат спирален дел кој служи за мешање и задржување на лушпите и семките подолго време во ширата. Секој ферментатор има електронска програма за вклучување и исклучување на системот за ротирање. Предност на овој тип на ферментатори е тоа што контактната површина помеѓу лушпите и семките и течниот дел е многу голема, и се протега низ целиот ферментатор. На тој начин и екстракцијата на фенолните и другите компоненти од грозјето е поголема. Секој ферментатор од ваков тип е снабден со посебен дел за излез на семките и лушпите, и по завршување на ферментацијата виното се одделува од густоот и цврст дел преку процес на ротирање. Температурата на ферментација се регулира преку ладење со вода која циркулира во дуплите ѕидови на ферментаторот. Изгледот на овој тип на ферментатори е даден на слика 14.



Слика 14. Ротоферментатор

1: рото мотор, 2: спирален внатрешен дел, 3: отвор за празнење

Figure 14. Rotofermenter

1: roto motor, 2: spiral inner part, 3: discharge hol



### **Ферментатор со потиснување (punchdown fermenter)**

Името на овие ферментатори потекнува од францускиот збор „pigeage“ што означува „потиснување надолу“. Ферментаторите со потиснување се направени од иноксен материјал и имаат цилиндрична форма и вертикална положба. На горниот дел се снабдени со специјален дел кој содржи еден или повеќе клипови кои можат да се движат нагоре и надолу. Целта на овие клипови е да извршат кршење на формируваниот слој од лушпите и семките. Овој слој уште се нарекува капа. Во процесот на ферментацијата, овој слој се крева нагоре под дејство на формируваниот јаглерод диоксид, и на тој начин контактот на лушпите и семките од грозјето со ширата е многу мал. Затоа, со помош на движење на овие клипови нагоре и надолу се врши кршење на капата и повторно враќање на семките и лушпите во ширата. На тој начин се постигнува ефикасна мацерација и екстракција на фенолните компоненти во виното. Во ова истражување програмата на овој тип на ферментатори е поставена така да врши потиснување четири пати во текот на еден ден. Празнењето на овој тип на ферментатори се врши преку специјален конусен дел поставен на дното од садот. Регулацијата на температурата се врши исто како кај ротоферментаторите, со циркулирање на ладна вода. Изгледот на овој тип на ферментатори е даден на слика 15.



Слика 15. Ферментатор со потиснување (punchdown)

1: клип, 2: метално сито, 3: отвор за празнење

Figure 15. Punch-down fermenter 1: clip, 2: metal sieve, 3: drain hol

## 1.6. Течна хроматографија

Течната хроматографија е една од најпознатите техники на разделување на компоненти во смеса. Кај оваа техника течниот примерок, или цврст примерок растворен во соодветен растворувач, се внесува во хроматографска колона со течна мобилна фаза. Во основа течната хроматографија е физичка метода која се темели на различните миграции на растворените супстанции низ систем сочинет од две фази од кои едната е мобилна (подвижна) а другата е стационарна (неподвижна) фаза (Гулабоски, 2019). Партиционата или распределителна хроматографија денес е најшироко употребувана хроматографска техника. Таа може да се подели на течно-течна хроматографија и хроматографија со хемиски врзана стационарна фаза (*chemically bonded phase chromatography*). Разликата меѓу нив е во начинот на кој стационарната фаза се „држи“ на пакувањето во колоната. Во течно-течната хроматографија стационарната фаза се „држи“ на пакувањето со физичка адсорпција, додека кај хемиски врзаните фази, како што и името кажува, стационарната фаза е врзана за носачот, најчесто силика гел, со ковалентна врска. Хемиски врзаните стационарни фази се добиваат со реакција на оргонохлоросилан со ОН- групите на површината на силика гелот, кои настануваат со хидролиза во разредена хлороводородна киселина. Производот од оваа реакција е органосилоксан, кој содржи -Si-O-Si-R група. Покрај овие неполарни групи, на површината на силика гелот може да се врзат и други органски функционални групи, како што се алифатични амини, етери, нитрили и ароматични јаглеводороди. Така, на располагање денес стојат стационарни фази со широк обем на поларности. Овој тип стационарни фази се многу постабилни од оние со физички адсорбирана стационарна фаза, каде е неопходно повремено повторно нанесување на течната стационарна фаза заради нејзиното постепено растворање во мобилната фаза (Гулабоски, 2019).

Во зависност од поларноста на стационарната и мобилната фаза, течната партициона хроматографија е поделена на нормално-фазна хроматографија (*normal-phase HPLC*) и реверзно-фазна хроматографија (*reversed-phase HPLC*). Во

нормално-фазната хроматографија стационарната фаза е поларна (вода, триетилен гликол), а мобилната фаза е неполарен растворувач (хексан, *i*-пропилетер), при што компонента со најмала поларност од пробата се елуира прва. Спротивно пак, во реверзно-фазната хроматографија, стационарната фаза е неполарна (јаглеводороди), а се користи поларен растворувач како мобилна фаза (вода, метанол, ацетонитрил) при што компонента со најголема поларност се елуира прва од колоната (Гулабоски, 2019). Ретенционите времиња се контролираат со изборот на мобилната фаза, при што помалку поларната мобилна фаза води до подолги ретенциони времиња. Кога два анализа се доволно добро раздвоени, со примена на пополарна мобилна фаза може да се добие раздвојување за пократко време. Зголемувањето на поларноста на мобилната фаза води до подолги ретенциони времиња, додека за пократки ретенциони времиња потребна е мобилна фаза со пониска поларност. Како показател за избор на мобилна фаза најприменуван е индексот на поларност  $P'$ . Во табела 1. даден е индексот на поларност на некои најчесто користени мобилни фази (Гулабоски, 2019).

Табела 1. Индекс на поларност на некои најчесто користени мобилни фази

Table 1. Polarity index of some commonly used mobile phases

<b>Мобилна фаза</b>	<b>Индекс на поларност, <math>P'</math></b>
Циклохексан	0,04
<i>n</i> -хексан	0,1
Јаглерод тетраклорид	1,6
<i>iso</i> -пропил етер	2,4
Толуен	2,4
Диетил етер	2,8
Тетрахидрофуран	4,0
Етанол	4,3
Етил ацетат	4,4
Диоксан	4,8
Метанол	5,1
Ацетонитрил	5,8
Вода	10,2

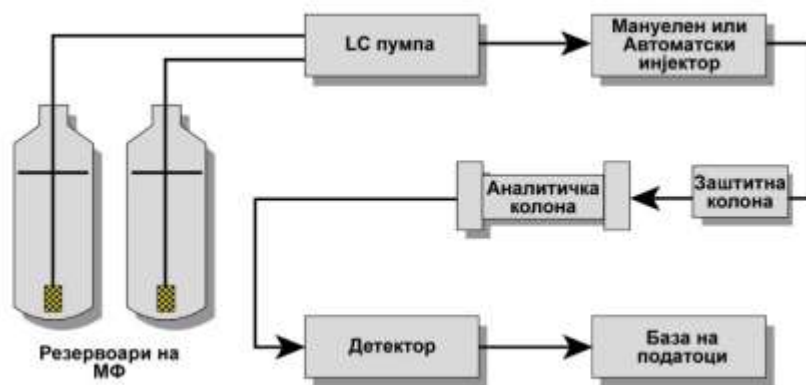
Кога при разделувањето се користи една мобилна фаза со постојан состав, елуирањето се нарекува *изократно*. Многу тешко е да се најде единствен состав на мобилната фаза кој е погоден за сите растворени супстанции. Затоа, најчесто се менува составот на мобилната фаза во тек на елуирањето, кое се нарекува *градиентно* елуирање.

### 1.7. Составни делови на течен хроматограф

Течниот хроматограф се состои од следните основни делови:

- Резервоар/и за мобилна фаза,
- Пумпа или систем на пумпи кои служат за движење на мобилната фаза,
- Инјектор,
- Хроматографска колона,
- Детектор,
- Компјутерски систем за контрола на сите уреди, собирање и обработка на податоци.

Шематскиот приказ на систем за течна хроматографија е прикажан на слика 16.



Слика 16. Шематски приказ на течен хроматограф

Figure 16. Schematic representation of liquid chromatograph

### ***Резервоари за мобилна фаза***

Мобилната фаза се наоѓа во резервоар (шише) кој најчесто е од стакло, но може да биде од челик или од висококвалитетен пластичен материјал. Мобилната фаза може да биде составена од еден или од повеќе растворувачи. Со употреба на еден растворувач може да се елуираат само некои компоненти од поларната смеса. За разделување на посилно врзаните компоненти од адсорбентот се користат „посилни“ средства за елуирање, со примена на техника на градиентно елуирање.

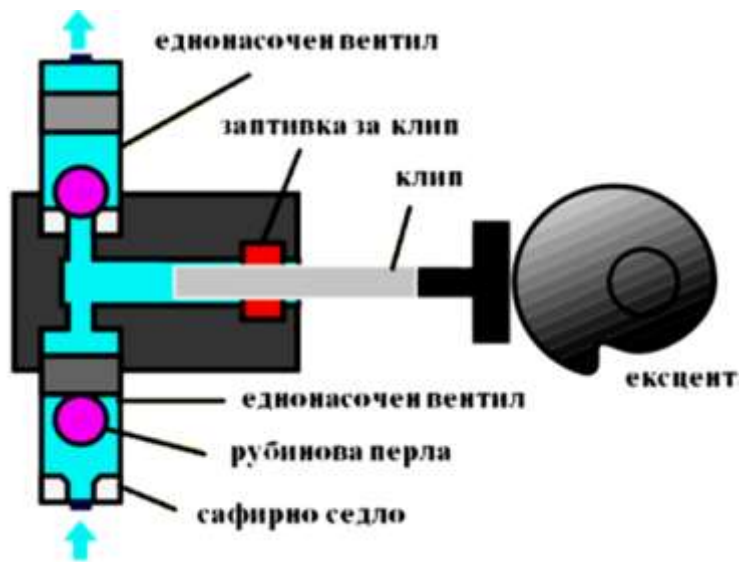
### ***Пумпи или систем од пумпи***

Пумпите кои се применуваат во системите за течна хроматографија се витален дел од системот. Дозволеният максимален оперативен притисок на пумпата зависи од аналитичките услови кои се применуваат. Изборот на протокот што пумпата мора да го задоволи зависи од работните услови, особено од дијаметарот на колоната и брзината на раздвојување. Пумпата мора да обезбеди константен и стабилен проток на мобилната фаза со прецизност  $<0,5\%$ , постигнување на работен притисок до 6000 psi, брзи промени во составот на мобилната фаза која минува низ колоната како и да обезбеди струење на мал

волумен од примерокот (Kavrovski, 1997). Пумпите кои се користат во течна хроматографија може да се поделат на неколку групи и тоа:

- Пневматски пумпи,
- Клипни пумпи,
- Хидраулични пумпи.

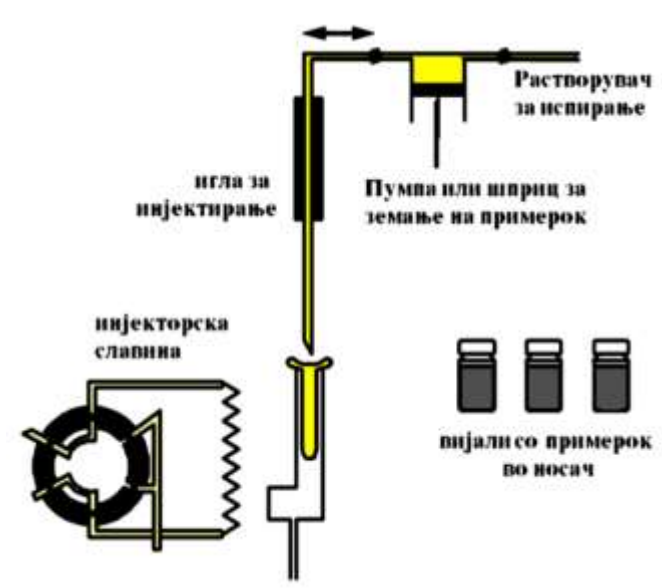
Најчесто применувани пумпи се механичките клипни пумпи. Пневматските пумпи се употребуваат во препаративни цели или за полнење на колоната, а хидрауличните пумпи денес многу ретко се произведуваат. Механичките клипни пумпи може да бидат со еден, два или три клипови (дуплекс, триплекс). Пумпите во течната хроматографија се користат за постигнување на висок притисок и работат преку механички подвижувач кој е во врска со електричен мотор. На слика 17 даден е шематскиот приказ на клипна пумпа со сите составни делови.



Слика 17. Шематски приказ на клипна пумпа  
Figure 17. Schematic representation of a piston pump

## **Инјектори**

Инјекторите се користат за внесување на примерокот во колоната. Особено е важно при инјектирањето на примерокот да не се наруши текот на мобилната фаза или да не се внесе гас кој би ја намалил ефикасноста на разделувањето. Инјекторот мора да биде издржлив на ниски и високи притисоци, хемиски да е инертен и да не стапува во интеракција со мобилната фаза и примерокот. Инјекторите може да бидат инјектори за мануелно или автоматско вбризгување. Денес, најчесто се користат системи за автоматско инјектирање. На слика 18 даден е шематскиот приказ на системите за автоматско инјектирање со сите негови составни делови.

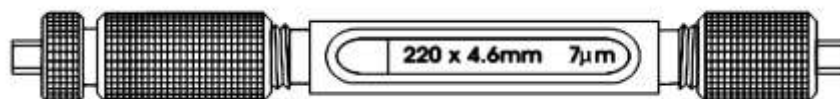


Слика 18. Шематски приказ на автоматски инјектор  
Figure 18. Schematic representation of an automatic injector

## **Хроматографски колони**

Колоните кои најчесто се користат во течната хроматографија се направени од челик, подебело стакло со челични облоги, титаниум или високо квалитетни пластични материјали исполнети со различни стационарни фази. Разликуваме препаративни, аналитички (конвенционални) и капиларни колони. Во течната хроматографија најчесто се употребуваат стандардните колони кои имаат должина

од 150 – 250 mm со внатрешен дијаметар 4,4 mm и големина на честичките на стационарната фаза 5 – 10  $\mu\text{m}$ . Шематскиот приказ на ваква стандардна C18 колона е дадена на слика 19.



Слика 19. Шематски приказ на стандардна C18 хроматографска колона  
Figure 19. Schematic representation of a standard C18 chromatographic column

Сидовите во внатрешноста на колоните се полирани и мазни. Протокот низ колоната е 1-2 mL/min со употреба на мобилна фаза (најчесто метанол или ацетонитрил во вода). Количината на аплициран примерок во колоната се движи од 1 ng – 1 mg. Работниот век на колоната е 500 – 2000 аплицирања или 3 – 24 месеци. Ефикасноста на колоната е пропорционална со нејзината должина. Можно е неколку колони со исти карактеристики да се спојат во серија со цел да се зголеми должината, а со тоа и ефикасноста. Протокот на мобилната фаза низ колоната е пропорционален со димензиите на честичките од стационарната фаза. Димензиите на честичките од стационарната фаза со која е исполнета колоната се мошне значаен фактор за разделување на супстанците. Колоните кои се исполнети со поголеми честички на стационарната фаза имаат поголем капацитет и може да адсорбираат поголемо количество од аплицираниот примерок. Помеѓу големите честички во колоната има поголеми простори и молекулите брзо поминуваат низ просторот, додека ситните молекули се задржуваат во внатрешноста на честичките на стационарната фаза и како резултат на ова се јавува широк пик. Во колоните со мали честички, помеѓу честичките речиси и да не постои празен простор, што придонесува за поголема ефикасност на разделувањето. Сите молекули со слична големина поминуваат низ колоната во приближно исто време. Комерцијално достапните колони се доста трајни доколку не се користат силно кисели или базни мобилни фази, или не се аплицираат нечисти примероци (Kavrakovski, 1997).



Колоните во системот може да се користат за работа на собна или покачена температура. Покачената работна температура на колоната се употребува за:

- Намалување на вискозноста на мобилната фаза, за да се постигне помал притисок и да се зголеми брзината на трансферот на масите,
- Зголемување на растворливоста на анализираниот примерок во стационарната фаза,
- Зголемување на растворливоста на примерокот во мобилната фаза.

Вообичаено, се употребува работна температура на колоната од 30 – 60 °C. По завршувањето на анализите се препорачува чистење на колоната. Најчесто се користи метанол како елуент за испирање на колоната.

Предколониите обично го содржат истиот материјал за полнење на стационарната фаза како и аналитичката колона и се користат за заштита на аналитичката колона од затнување со различни нечистотии кои влегуваат при инјектирањето на примерокот.

### ***Детектори***

Детекторите кои се користат во течната хроматографија мора да бидат осетливи на ниски концентрации за секоја компонента од примерокот. Детекторот треба да обезбедува линеарен одговор кој се протега преку три реда на големина на концентрација и да не ги проширува елуираните пикови. Тој не треба да е осетлив на компонентите од мобилната фаза ниту пак на промените во нејзиниот состав. Детекторот не треба да е осетлив на промените на притисокот, температурата и протокот. Вакви идеални детектори секако не постојат, но конструирани се детектори кои приближно ги задоволуваат овие потреби. Најчесто користени детектори во течна хроматографија се ултравиолетовите (UV) детектори, ултравиолетово-видливите (Uv/Vis) детекторите кои може да бидат со фиксна бранова должина, со променлива бранова должина или со низа од диоди (diode-array detector, DAD). Друг тип на детектори се флуоресцентните детектори (FD), детектори на индекс на прекршување (RID), електрохемиски детектори, а најосетливи се масените детектори (MS) (Ivanova, 2014).

## 1.8. Масена спектрометрија

Масената спектрометрија (MS) е доста применувана и ефикасна техника која има голема важност во процесот на идентификација и квантификација на разделените компоненти од различни матрикси по елуирањето од хроматографската колона. Масената спектрометрија се базира на создавање на јони од анализаторот, на кои се врши анализа преку односот маса/полнеж ( $m/z$ ) и нивна детекција. Често применуван термин кај масената спектрометрија е „молекулски јон“. Под поимот „молекулски јон“ се подразбира честичка која настанала од цела молекула, со отстранување на протон или хидрид (протон со два електрони) (Watson, 2005).

### **Фрагментен јон**

Фрагментен јон настанува при разложување на друг јон и означува јон кој настанал со фрагментација на молекулски јон или честичка како протонирана молекула, депротонирана молекула, јон настанат со одделување на водороден јон, молекула која содржи натриум и сл. Фрагментните јони може да се формираат и од фрагментен јон формиран од молекулски јон при т.н. секундарна фрагментација. Фрагментните јони се формираат преку раскинување на хемиските врски и тие секогаш имаат маса помала од масата на нивниот прекузор (Watson, 2005).

### **Пикови**

Во масената спектрометрија пиковите ги претставуваат јоните кои се формираат во масениот спектрометар. Пикот со најголем интензитет во масениот спектар се нарекува основен пик. Прикажувањето на масените спектри може да биде апсолутно, со интензитет на пик кој ја прикажува актуелната вредност добиена за интензитетот на тековниот јон за јон со истата  $m/z$ , или пиковите може да имаат релативен интензитет кој ги прикажува податоците на начин на кој интензитетот на основниот пик е 100 %.

Масените спектрометри главно се состојат од три важни компоненти, и тоа: јонски извор, масен анализатор и детектор. Од физичко-хемиските својства на анализаторот како што се испарливост, молекулска маса, термостабилност, како и од

комплексноста на матриксот, зависи изборот на јонизационата метода. Јонските извори можат да се поделат на две групи:

- Јонски извори кои бараат примерокот да биде во гасна фаза пред да биде јонизиран.
- Извори кои се користат за примероци со мала испарливост и големи молекулски маси.

Во првата група на јонски извори спаѓаат: извори за електронска јонизација (EI) и извори за хемиска јонизација (CI). Во втората група спаѓаат извори кои оперираат со раствори од примерокот или електроспреј јонизација (ESI), хемиска јонизација при атмосферски притисок (APCI), фотојонизација под атмосферски притисок (APPI), и извори кои се базираат на десорпција на примерокот и јонизација од цврст супстрат (MALDI) (Гулабоски, 2019).

Постојат повеќе типови на масени анализатори, а во овој магистерски труд е користен комбиниран масен анализатор составен од два анализатори поврзани во серија и тоа квадрупол (Q) и масен анализатор со време на прелетување (TOF), кој се означува со кратенката Q-TOF. Изгледот на овој масен анализатор е прикажан на слика 20.



Слика 20. Масен анализатор Q-TOF

Figure 20. Q-TOF mass analyzer

### ***Q-TOF (Q-квадрупол со масен анализатор со време на прелетување - TOF)***

Функционирањето на квадруполниот масен анализатор се заснова на осцилација на јоните кога тие поминуваат низ аксијално симетрично радиофреквентно поле. Овие анализатори се базираат на следната равенка:

$$m/z = B^2 r^2/2U$$

каде што  $r$  е константна величина за даден тип на инструмент, а напонот на забрзување  $U$  се одржува константен во текот на мерењето. Заради тоа што за голем број јони вредностите за  $z = 1$ , произлегува дека  $m$  масата на јоните е пропорционална со јачината на магнетното поле  $B$ . Со рамномерно менување на јачината на магнетното поле, јоните со различни маси се доведуваат до централниот дел, при што им се овозможува пат за поминување кон детекторот, така што разделувањето на масите може да се врши со промена на јачината на магнетното поле. Во принцип, снимањето на масениот спектар се прави со постепено променување на јачината на магнетното поле со константен полнеж на забрзаните јони. Јоните кои се разделени на овој начин пристигнуваат до детекторскиот систем, кој го регистрира нивното присуство и сигналот се пренесува во системот за регистрација.

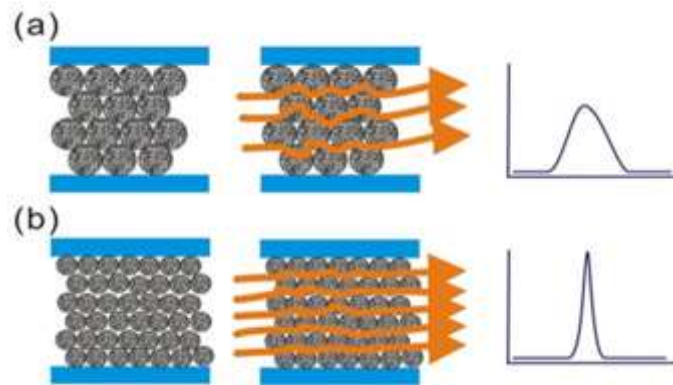
Кај анализаторите кои функционираат на база на време на прелетување (TOF-Time of Flight), јоните со различна маса ќе имаат различна почетна брзина. Ако при тоа растојанието кое јоните треба да го поминат е фиксирано, времето на прелетување ќе зависи од масата, при што полесните јони ќе патуваат побргу и ќе стигнат од изворот до детекторот за пократок временски период. На тој начин времето на прелетување на јоните е пропорционално со квадратниот корен од односот на нивната маса и полнеж, а детекторот ќе регистрира јони кои се разделени по време на прелетување (Tomljanović, 2000).

## 1.9. Ултрависокоефикасна течна хроматографија (UPLC)

Ултрависокоефикасната течна хроматографија (UPLC) е важна техника која се користи за одделување на компоненти во сложени матрикси и нивна идентификација и квантификација.

Оваа техника е базирана на помали димензии на честички на стационарната фаза и пократки колони во однос на високоефикасната течна хроматографија (HPLC). На тој начин се надминуваат недостатоците на регуларната високоефикасна течна хроматографија, а тоа се брзината, ефикасноста на разделување и резолуцијата, кои се помали кај регуларната високоефикасна течна хроматографија во споредба со ултрависокоефикасната течна хроматографија. UPLC се базира на *Van Deemter* равенката која ја покажува врската помеѓу линеарната брзина на мобилната фаза и висината на еден теоретски под во колоната (plate height). Помалите честички на стационарната фаза која ги користи оваа метода (дијаметар на честичките помал од 2  $\mu\text{m}$ ) овозможува со оваа метода да се работи под повисок притисок од 6 000 до 15 000 psi. Кај регуларната високоефикасна хроматографија (HPLC) максималните притисоци се до 4 000 psi. Утврдено е дека со намалувањето на димензиите на честичките во колоната се постигнува значително подобрување на ефикасноста во разделувањето на компонентите, се добиваат поостри пикови во хроматограмите, а се намалува времето за анализа скоро на половина од обичната високоефикасна течна хроматографија (слика 21). Кај UPLC потрошувачката на елуенти е речиси половина помалку споредено со потрошувачката кај регуларната течна хроматографија, времето се скратува на половина, а притисокот може да се искачи и до 1000 psi, со што се зголемува ретенциониот фактор на разделување. UPLC користи помал волумен на инјектиран аналит, а исто така оваа метода овозможува користење на повисоки температури со што се редуцира вискозноста на мобилната фаза, кое резултира со висок коефициент на дифузија и зголемување на позадинскиот притисок, без притоа да имаме промена во ефикасноста на разделување.

Општиот заклучок е дека UPLC во споредба со HPLC е побрза, користи помал волумен на елуенти, работи на повисоки температури со повисок притисок и разделувањето е поефикасно.



Слика 21. Влијание на големината на честичките врз резолуцијата

(a) колона за HPLC, (б) колона за UPLC

Figure 21. Impact of particle size on resolution

(a) column in HPLC, (b) column in UPLC

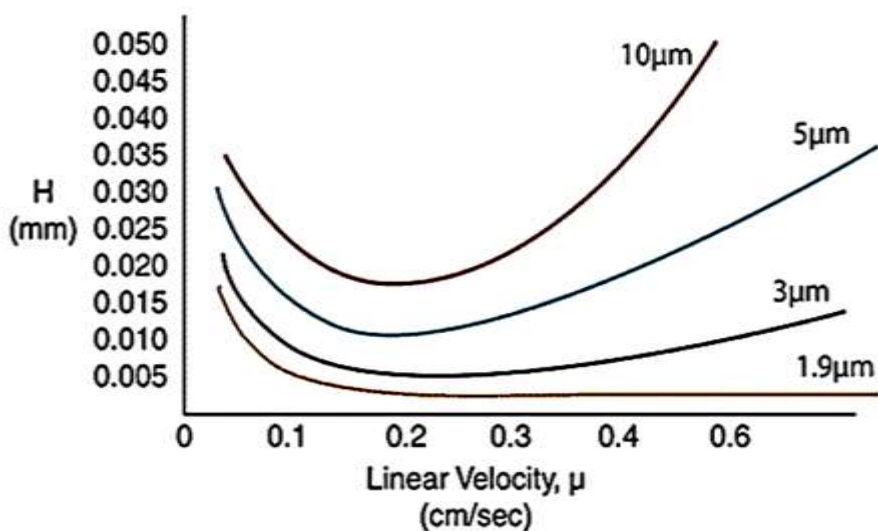
Ултивисокоефикасната течна хроматографија е базирана на *Van Deemter*-овата равенка, која ја објаснува релацијата помеѓу линеарната брзина на мобилната фаза ( $v$ ) и висината на еден теоретски под ( $H$ ) со помош на 3 параметри  $A$ ,  $B$  и  $C$ , кои се во врска со големината и формата на честичките од стационарната фаза ( $A$ ), дифузијата на молекулите од супстанците низ стационарната и мобилната фаза при нивното минување низ хроматографската колона ( $B$ ) и отпорот кон трансфер на маса од едната во другата фаза во хроматографскиот систем ( $C$ ):

$$H = A + B/v + Cv$$

Овде  $H$  претставува висина на еден теоретски под,  $A$ ,  $B$  и  $C$  се константи за даден хроматографски систем, а  $v$  е брзината на мобилната фаза (пропорционална со протокот), која е променливата величина. Бидејќи во оваа метода се користат

помали честички, протокот ќе биде поголем, а со тоа и брзината, резолуцијата и ефикасноста на оваа метода е подобра.

Ефектот на големината на честичките врз ефикасноста која се гледа од висината на еден теоретски под ( $H$ ) е илустрирана на слика 22. Имено, помало  $H$  значи поголем број на теоретски подови на единица должина на колоната и според тоа поголема ефикасност. Како резултат на горенаведените карактеристики, во ултрависокоефикасната течна хроматографија (UPLC), со намалување на големината на честичките на стационарната фаза е намалена висината на еден теоретски под и со помала должина на колоната разделувањето е побрзо и со поголема ефикасност и резолуција.



Слика 22. Van Deemter-ов дијаграм за влијанието на големината на честичките на висината на еден теоретски под

Figure 22. Van Deemter influence of particle size on plate size

Ултрависокоефикасната течна хроматографија (UPLC) има и свои недостатоци: висок позадински притисок, пократок животен век и ефикасност на честичките во стационарната фаза. Како резултат на тоа и времето на користење на колоните е пократко отколку кај колоните во високоефикасната течна

хроматографија (HPLC). За жал, честичките со дијаметар помал од 2  $\mu\text{m}$  многу тешко се регенерираат и стануваат неупотребливи.

Во UPLC, начинот на работа е ист како и кај HPLC со таа разлика што кај ултрависокоефикасната течна хроматографија волуменот на инјектиран примерок е помал. Инјектирањето се врши мануелно или со автоматски инјектор и мора да биде многу побрзо во споредба со инјектирањето кај HPLC, заради поголемиот притисок. Како детектори во ултраефикасната течна хроматографија се користат истите детектори како и кај HPLC.

Како резултат на поголемата брзина на разделување, ултраефикасната течна хроматографија наоѓа широка примена во аналитичката хемија за разделување на компоненти од сложени матрикси. Со оваа метода се врши разделување и потоа идентификација и квантификација на активни компоненти во фармацевтската индустрија, биолошките лаборатории, медицинските и биохемиските лаборатории. Се применува и во индустријата за производство на парфемии и етерични масла од растенијата, како и во лабораториите за анализа на храна и пијалаци, како што е виното.



## 2. Цел на истражувањето

Во овој магистерски труд се определува полифенолниот состав на вина од сортите Вранец и Мерло, произведени во индустриски размери, под исти услови и со три различни методи на ферментација: класична метода, рото метода и метода со потиснување (punch-down). Целта е да се определи со која од овие три методи се постигнува најдобра екстракција на полифенолните компоненти во виното, а со тоа се добива вино со најдобра структура, тело и квалитет.

Хемискиот состав на вината е определен со класични методи на анализа кои ги опфаќаат основните параметри на виното, спектрофотометриски методи на анализа на вкупни феноли, антоцијани, боја, бакар и железо, додека анализата на индивидуалните полифеноли е изведена со примена на ултрависокоефикасна течна хроматографија (UPLC) во комбинација со масена спектрометрија (MS).

Истражувачката работа ги вклучува следните активности:

1. **Берба на грозје** од сортите Вранец и Мерло, во раните утрински часови. Грозјето е одгледувано во винскиот Овчеполски регион, и берено во септември 2021, со оптимална технолошка зрелост (околу 22 °Brix).
2. **Производство на вино** од сортите Вранец и Мерло со три методи на ферментација: класична метода, рото метода и punch-down метода. При сите винификации се применуваат исти услови на ферментација и исти енолошки средства.
3. **Хемиски анализи:** **(а)** Определени се следните основни хемиски параметри на виното: алкохол, екстракт, вкупни киселини, испарливи киселини, шеќер, слободен и вкупен SO<sub>2</sub>; **(б)** Извршени се спектрофотометриски анализи за определување на вкупни антоцијани, вкупни феноли, интензитет на боја и нијанса како и определување на содржината на бакар и железо. **(в)** Индивидуалните полифеноли се анализирани со UPLC-QTOF-MS техника. Идентификацијата на соединенијата е направена со споредба на масените спектри на соединенијата од интерес со спектри објавени во литература.
4. **Обработка на резултатите** со примена на статистички методи. Резултатите

статистички се обработени во Excel, вклучувајќи пресметување на средна вредност, стандардна девијација, релативна стандардна девијација. Обработка на податоците од UPLC е извршена со Agilent MassHunter Qualitative Analysis Navigator B.08.00 – QualDAM софтвер.

Резултатите од оваа магистерска работа ќе бидат од голема важност за винската индустрија во Македонија, со посебен акцент на сортите Вранец и Мерло, со цел промовирање на квалитетот на македонските вина. Исто така, овој магистерски труд дава придонес во утврдување на најпогодната метода на ферментација за екстракција на полифенолните компоненти во виното со која ќе се добива вино со најдобар квалитет.

### 3. Методи на научноистражувачка работа

#### 3.1. Стандарди и реагенси

Метанол и оцетна киселина со HPLC чистота се набавени од Sigma-Aldrich, (Germany). Стандардите од полифенолни (гална киселина, ферулна киселина, *p*-кумарна киселина, 3,4-дихидроксибензоева киселина, кафена киселина, сиригинска киселина, рутин, кверцетин и ресвератрол) беа набавени од Merck (Darmstadt, Germany). NaOH, концентрирана H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, фенолфталеин, бромтимол сино, скроб, KI, Фелинг I, Фелинг II и пуферни раствори со pH 4, pH 7 и pH 14 се набавени од Алкалоид-Скопје и сите имаа аналитички степен на чистота (p.a). Спектрофотометриските анализи на бакар и железо беа направени со комерцијално достапни китови Enzyrec Color Iron (Ferene-S) и Enzytec Color Copper кит (r-Biopharm, Darmstadt, Germany). Растворите беа подготвени со деминерализирана вода со кондуктивност од 0,005  $\mu$ S, добиена со уред за мембранска филтрација (Millipore, Molsheim France).

#### 3.2. Грозје

Грозјето од сортите Вранец и Мерло е одледувано и набрано од Овчеполското Виногорје.

Грозјето од сортата Вранец беше собирано од 15 годишни лозови насади во село Трогерци (Овчеполско Виногорје). Површините на лозовите насади е 20 ha, растојание меѓу лозите во редот е 1 m, а помеѓу редовите 2,6 m. За да се постигне планираниот принос од овие лозови насади од 18 000 kg/ha, на секоја лоза беа оставени по 20 родни зимски окца, односно 8 окца на m<sup>2</sup> или вкупно 76 920 родни окца на хектар површина. Експозицијата на лозовите насади е север-југ. Просечно беа собрани околу 20 t грозје по хектар површина.

Грозјето од сортата Мерло потекнуваше од с. Ерџелија (Овчеполско Виногорје). Насадите беа со површина од 15 ha, растојание помеѓу лозите од 1,5 m а помеѓу редовите 2,6 m со експозиција север-југ. За да се постигне принос од околу

10 000 kg/ha, при резидбата беа оставени просечно на секоја лоза 24 родни зимски окца, односно по 9 окца на m<sup>2</sup> или вкупно 92 304 родни окца по хектар површина. Староста на лозовите насади е 20 години.

Грозјето од двете сорти е собирано во пластични гајби и е транспортирано во винарската визба Имако – Штип на понатамошна обработка.

### 3.3. Производство на вино од сортите Вранец и Мерло

Производството на вино од двете сорти на грозје, Вранец и Мерло (*V. Vinifera* L.) беше извршено со примена на исти технолошки и енолошки постапки. Така, бербата на грозјето од двете сорти, Вранец и Мерло е направена во септември 2021, со оптимална технолошка зрелост (околу 22 °Brix за двете сорти). Грозјето (5 000 kg од секоја сорта одделно) е транспортирано до винарската визба Имако Вино во Штип и е пристапено кон негова обработка. Гмечењето на грозјето и издвојувањето на дршките е извршено со механичка гмечалка/дестимер (Della Toffola Treviso-Italy). Произведената гроздова каша од двете сорти потоа е транспортирана во систем за ладење на температура од 15 °C. Ладењето е вршено со помош на топлотен изменувач (Della Toffola Treviso-Italy). За да се спречи оксидација, изладената гроздова каша беше третирана со сулфур диоксид во форма на 5 % раствор, до максимална концентрација на слободен SO<sub>2</sub> од 40 mg/L. После ладењето и сулфитирањето, гроздовата каша е транспортирана во соодветен ферментатор: класичен, рото и ферментатор со потиснување (punch-down). Сите три вида на ферментатори се со волумен од 9 000 L.

Во секој ферментатор беше додаден пектолитички ензим (Sodinal, Speed up Rouge, 20 g/100 L). По три часа, гроздовата каша во секој ферментатор беше инокулирана со комерцијален квасец *Saccharomyces cerevisiae* (Sodinal FERMCTIVE ROUGE, 20 g/100 L претходно активиран и рехидриран во вода на 30 °C), проследено со додавање на хранливи материи на база на азот (амониум дихидроген фосфат, 10 g/100 L), кои му се потребни на квасецот за целосно и успешно да

ја спроведе ферментацијата. Алкохолната ферментација во сите три ферментатори траеше 9 дена и за двете сорти, и притоа температурата постојано се контролираше со систем за ладење на 24 °C.

Мацерацијата на гроздовата каша беше извршена на различен начин во зависност од типот на ферментаторот. Во класичниот ферментатор контактот помеѓу ширата, лушпите и семките беше постигнат преку мешање со помош на центрифугална пумпа која врши испумпување на течноста заедно со семките и лушпите (од долниот дел во горниот дел на ферментаторот) и на тој начин предизвикува мешање и го подобрува контактот помеѓу ширата и цврстите делови од грозјето. Мешањето беше програмирано со вклучување на пумпата 4 пати на ден. Во рото ферментаторот мацерацијата се вршеше со ротирање на кашата 4 пати на ден. При оваа ротација настанува мешање на ширата и цврстите делови од грозјето по должината на целиот ферментатор. Кај ферментаторот со потиснување се вршеше рушење на формираната капа од семки и луспи и нивно враќање во течниот дел со помош на клип кој беше програмиран да потиснува 4 пати на ден.

По завршување на алкохолната ферментација и мацерација (измерена содржина на редуцирачки шеќер пониска од 5 g/L), виното од секој од трите ферментатори е одделено од комињето (цврстите делови, лушпите и семките) со помош на пресување. Добиеното вино од секој ферментатор одделно е транспортирано во чиста иноксна цистерна (7 000 L). Вината се преточени и оставени да мируваат во период од две недели. По завршување на јаболково-млечната ферментација, вината повторно се сулфитирани со 5 % раствор од сулфуреста киселина до концентрација на слободниот сулфур од 40 mg/L. Потоа, вината беа оставени на ниска надворешна температура во период од два месеци (декември и јануари) за спроведување на природна тартаратна стабилизација. По завршување на стабилизацијата, виното е полнето во шишиња од 0,75 L, под инертна атмосфера на азот за да се спречи процесот на оксидација. Шишињата со вино се чувани во подрум на температура од 2-8 °C во времетраење од еден месец. Оznakите на примероците вино се прикажани во табела 2.

Табела 2. Ознаки на примероците вино  
Table 2. Labels of wine samples

Тип на ферментатор	Кратенки на вината	
	Вранец	Мерло
Класичен	В-К	М-К
Рото	В-Р	М-Р
Потиснување	В-П	М-П

### 3.4. Определување на основни параметри

Со цел да се утврди општиот хемиски состав на вината, беа користени официјални методи за анализа на вино според OIV, 2016, при што се определени следните параметри: алкохол (OIV-MA-AS-312-01A), сув екстракт (OIV-MA-AS2-03B), специфична тежина (OIV-MA-AS2-01A), вкупни киселини (OIV-MA-AS313-01), испарливи киселини (OIV-MA-AS313-02), вкупен и слободен SO<sub>2</sub> (Ivanova-Petropulos & Mitrev, 2014).

#### 3.4.1. Определување на алкохол, екстракт и специфична тежина

Определувањето на содржината на алкохол, екстракт и специфична тежина во примероците од вино беше направено со помош на хидростатска вага (GIBERTINI Milano-Italy). Примероците најпрво беа темперирани на температура од 20 °C во период од еден час. Најпрво беше измерена специфичната тежина на виното, со директно мерење на примерокот вино на хидростатската вага и резултатот беше мемориран во програмата на инструментот. Волумен од 100 mL вино е измерен во специјална волуметриска колба (GIBERTINI D.E.E) и квантитативно виното е префрлено во капсула за дестилација (GIBERTINI SUPER D.E.E Milano-Italy). Колбата неколку пати беше промиена со дестилирана вода и поставена како приемна колба на инструментот. Во капсулата за дестилација каде

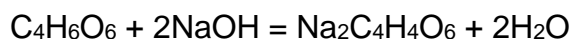
што се наоѓа примерокот вино, додадено беше 1 mL силиконски антипенител и 2 mL варно млеко (10 % раствор од  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ). Извршена е дестилација на примерокот при што беше собрано 70 mL дестилат во приемната колба. Дестилацијата се вршеше автоматски и траеше 7 min. Добиениот дестилат е темпериран на 20 °C во период од 20-30 min, потоа колбата е дополнета до марката со дестилирана вода. Потоа дестилатот беше префрлен во хидростатската вага. Од менито на вагата се повикува измерената специфична тежина на соодветниот примерок и на мониторот на вагата се отчитуваат резултати за содржината на алкохол изразена во % (vol), екстрактот изразен во единица g/L и специфичната тежина на примерокот вино.

### 3.4.2. Определување на вкупни киселини

Вкупните киселини во виното беа определени со волуметриски метод. При тоа, волумен од 10 mL вино беше префрлен во ерленмаер од 500 mL и во него беше додадено 2 mL индикатор бромтимол сино. Вака подготвената проба беше титрирана со стандарден раствор од натриум хидроксид со концентрација од 0,1 mol/L до промена на бојата од црвено-жолта до сино-зелена. Беше отчитан волуменот на потрошениот раствор од натриум хидроксид и беше пресметана содржината на вкупните киселини (изразени како g/L винска киселина) по следната равенка:

$$\text{Содржина на вкупни киселини}/(\text{g/L}) = V(\text{NaOH}) \cdot 0,75$$

Факторот 0,75 е фактор кој се добива од равенката за реакцијата на неутрализација на винската киселина со натриум хидроксид.



$$n(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6)/n(\text{NaOH}) = 1/2$$

$$2n(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6) = n(\text{NaOH})$$

$$2 \cdot m/M (\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6) = V(\text{NaOH}) \cdot c(\text{NaOH})$$

$$m(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6) = V(\text{NaOH}) \cdot c(\text{NaOH}) \cdot M(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6)/2 \cdot V(\text{Вино})$$

Пресметувањето се вршеше на следниот начин:

$$\text{Вкупни киселини g/L} = 7,5 \text{ mL} \cdot 0,1 \text{ mol/L} \cdot 150 \text{ g/mol} / 2 / 10 \text{ mL}$$

$$\text{Вкупни киселини g/L} = 7,5 \text{ mL} \cdot 0,75 \text{ g/(L}\cdot\text{mL)}$$

$$\text{Вкупни киселини g/L} = 7,5 \cdot 0,75$$

$$\text{Вкупни киселини g/L} = 5,6 \text{ g/L}$$

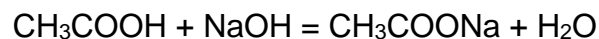
$$\text{Вкупни киселини g/L} = V(\text{NaOH}) \cdot 0,75$$

### 3.4.3. Определување на испарливи киселини

Содржината на испарливите киселини во виното е определена со дестилација на примерокот во присуство на водна пара. Дестилацијата беше извршена со дестилатор (DIONIS ELENA SUPER D.E.E. Ruse-Bulgaria). Волумен од 10 mL примерок беше ставен во системот за дестилација со водна пара. Беа собрани 200 mL дестилат. Дестилатот е титриран со раствор од натриум хидроксид и фенолфталеин како индикатор до бледо розова боја. Резултатот за содржината на испарливите киселини беше изразен во еквиваленти на оцетна киселина (g/L оцетна киселина), според следната равенка:

$$\text{Содржина на испарливи киселини g/L} = V(\text{NaOH}) \cdot 0,6$$

Факторот 0,6 се добива од реакцијата на неутрализација на оцетната киселина со натриум хидроксид.



$$n(\text{CH}_3\text{COOH}) = n(\text{NaOH}) = 1:1$$

$$m/M(\text{CH}_3\text{COOH}) = c(\text{NaOH}) \cdot V(\text{NaOH})$$

$$m(\text{CH}_3\text{COOH}) = c(\text{NaOH}) \cdot V(\text{NaOH}) \cdot M(\text{CH}_3\text{COOH}) / V(\text{Вино})$$

Пресметувањата се вршеа по следната равенка:

$$\text{Испарливи киселини g/L} = 0,7 \text{ mL} \cdot 0,1 \text{ mol/L} \cdot 60 \text{ g/mol} / 10 \text{ mL}$$

$$\text{Испарливи киселини g/L} = 0,7 \text{ mL} \cdot 0,6 \text{ g}$$



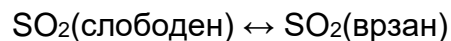
Испарливи киселини g/L = 0,7 · 0,6

Испарливи киселини g/L = 0,42 g/L

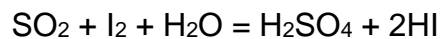
**Испарливи киселини g/L = V(NaOH) · 0,6**

#### **3.4.4. Определување на слободен и вкупен SO<sub>2</sub>**

Сулфур диоксидот во виното постои во слободна и врзана форма. Сулфур диоксидот кој е поврзан со алдехидите, танините, шеќерите или антоцијаните се нарекува врзан сулфур диоксид. Слободниот и врзаниот сулфур диоксид во виното се во динамичка рамнотежа која е претставена со следната равенка:



Определувањето на слободниот и вкупниот SO<sub>2</sub> беше извршено со јодометриска титрација во присуство на индикатор скроб. Користен е стандарден раствор од јод со концентрација од 0,01 mol/L и 1 % раствор од скроб, раствор на сулфурна киселина (1:3) и раствор од натриум хидроксид со концентрација 1 mol/L. Сулфур диоксидот реагира со растворот од јод по следната равенка:



За определување на слободен SO<sub>2</sub>, волумен од 50 mL вино беше префрлен во ерленмаер од 500 mL и во него беше додадено 10 mL раствор на сулфурна киселина (1:3) и 2 mL 1% раствор од скроб. Пробата беше титрирана со раствор од јод (0,01 mol/L) до појава на пурпурно сина боја. Беше отчитан потрошениот волумен на јод и пресметана содржината на слободен сулфур диоксид според следната равенка:

$$\text{Слободен SO}_2 \text{ (mg/L)} = V(I_2) \cdot c(I_2) \cdot M(\text{SO}_2) \cdot 1000/V(\text{Вино})$$

$$\text{Слободен SO}_2 \text{ (mg/L)} = V(I_2) \cdot 12,8$$

V- волумен (во mL) на потрошениот раствор од јод со концентрација  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$   
12,8 – фактор кој се добива од хемиската реакција на јод со  $\text{SO}_2$

За определување на вкупниот  $\text{SO}_2$ , 50 mL вино беше префрлено во ерленмаер од 500 mL и во него беше додадено 25 mL раствор од натриум хидроксид ( $1 \text{ mol/L}$ ). Ерленмаерот беше покриен со саатно стакло и оставен да мирува 30 min за да се изврши хидролиза. Потоа, беа додадени 15 mL раствор од сулфурна киселина (1:3) и 1 mL раствор од скроб. Пробата се титраше со раствор од јод ( $0,01 \text{ mol/L}$ ) до промена на бојата од црвена во пурпурно сина. Содржината на вкупен  $\text{SO}_2$  беше пресметана со следната равенка:

$$\text{Вкупен SO}_2 \text{ (mg/L)} = V(I_2) \cdot c(I_2) \cdot M(\text{SO}_2) \cdot 1000/V(\text{Вино})$$

$$\text{Вкупен SO}_2 \text{ (mg/L)} = V(I_2) \cdot 12,8$$

V- волумен на потрошениот раствор од јод со концентрација  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$   
12,8 – фактор кој се добива од хемиската реакција на јод со  $\text{SO}_2$

### **3.4.5. Определување на редуцирачки шеќери**

За определување на редуцирачки шеќери, виното најпрво беше разредено во однос 1:10. Потоа, во ерленмаер од 100 mL беа додадени 10 mL Фелинг I и 10 mL Фелинг II, а потоа кон нив беше додадено 10 mL од разреденото вино. Ерленмаерот беше покриен со саатно стакло и загреван до вриење. Потоа, растворот беше оладен до собна температура (под млаз ладна вода) и во него беа додадени 2 g кристали од калиум јодид и 10 mL раствор од сулфурна киселина (1:4). Ерленмаерот повторно беше покриен со саатно стакло и оставен на темно место да мирува 2 min. Потоа, беше извршена титрација со стандарден раствор од натриум тиосулфат ( $0,1 \text{ M}$ ) до појава на бледо жолта боја, па беше додаден индикатор скроб

при што растворот доби сина боја. Беше продолжено со титрацијата сè до појава на млечно бела боја. Напредно беше подготвена и слепа проба на истиот начин како за виното само што наместо вино беше додадено 20 mL дестилирана вода и беше титрирано на истиот начин како и примерокот вино. Волуменот на потрошен натриум тиосульфат беше пресметан како разлика од волуменот на натриум тиосульфат потрошен за пробата и волуменот потрошен за слепата проба:

$$V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)_{\text{слепа проба}} - V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)_{\text{проба}}$$

Пресметаниот волумен се отчитува од табела за содржина на редуцирачки шеќери (g/L) (Табела 3).

Табела 3. Содржина на редуцирачки шеќери

Table 3. Content of reducing sugars

V (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) mL	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	0,0	0,3	0,6	1,0	1,3	1,6	1,9	2,2	2,6	2,9
1	3,2	3,5	3,8	4,2	4,5	4,8	5,1	5,4	5,7	6,1
2	6,4	6,7	7,1	7,4	7,7	8,1	8,4	8,7	9,0	9,4
3	9,7	10,0	10,4	10,7	11,0	11,4	11,7	12,0	12,3	12,7
4	13,0	13,3	13,7	14,0	14,4	14,7	15,0	15,4	15,7	16,1
5	16,4	16,7	17,1	17,4	17,8	18,1	18,4	18,8	19,1	19,5
6	19,8	20,1	20,5	20,8	21,2	21,5	21,8	22,2	22,5	22,9
7	23,2	23,5	23,9	24,2	24,6	24,9	25,2	25,6	25,9	26,3
8	26,5	26,9	27,3	27,6	28,0	28,3	28,6	29,0	29,3	29,7
9	29,9	30,3	30,7	31,0	31,3	31,7	32,0	32,3	32,7	33,0
10	33,4	33,7	34,1	34,4	34,8	35,1	35,4	35,8	36,1	36,5
11	36,8	37,2	37,5	37,9	38,2	38,6	38,9	39,3	39,6	40,0
12	40,3	40,7	41,0	41,4	41,7	42,1	42,4	42,8	43,1	43,5
13	43,8	44,2	44,5	44,9	45,2	45,6	45,9	46,3	46,6	47,0
14	47,3	47,7	48,0	48,4	48,7	49,1	49,4	49,8	50,1	50,5
15	50,8	51,2	51,5	51,9	52,2	52,6	52,9	53,3	53,6	54,0
16	54,3	54,7	55,0	55,4	55,8	56,2	56,5	56,8	57,3	57,6
17	58,0	58,4	58,8	59,1	59,5	59,9	60,3	60,7	61,0	61,4
18	61,3	62,2	62,5	62,9	63,3	63,7	64,0	64,4	64,8	65,1
19	65,5	65,9	66,3	66,7	67,1	67,5	67,8	68,2	68,6	69,1
20	69,4	69,8	70,2	70,6	71,0	71,4	71,8	72,1	72,5	72,9

### **3.4.6. Определување на рН**

Определувањето на рН на виното беше направено со рН – метар (METLER TOLLEDO SevenCompact pH/Ion S220-Switzerland). Пред мерењата, инструментот беше калибриран со пуферски раствори со рН: 4, 7 и 14, а потоа е пристапено кон мерење на примероците од вино.

### **3.5. Спектрофотометриски методи на анализа**

Спектрофотометриските методи за анализа се користени за определување на вкупни феноли (ВФ), вкупни антоцијани (ВА), интензитет на боја (ИБ), нијанса (Н), железо и бакар. Спектрофотометриските анализи беа направени со спектрофотометар (Spectroquant Pharo 300 Mettler Toledo-Germany).

#### **3.5.1 Определување на вкупни феноли**

Вкупните феноли во виното беа определени со метода на Фолин-Чиколто (Ivanova et al., 2010). Волумен од 1 mL вино беше пренесен во волуметриска колба од 10 mL, во која претходно е додадено 5 mL дестилирана вода и 0,5 mL реагенс Фолин-Чиколто. После 3 min беше додаден 1,5 mL раствор на  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (5 g/L) и колбата беше дополнета со дестилирана вода до марката. Примероците беа оставени да стојат 16 min во водна бања на температура од 50 °C, и потоа беа оладени на собна температура. За конструирање на калибрациона крива беа користени стандардни раствори од гална киселина во опсег од 0-100 mg/L. Мерењата беа извршени со кварцна кивета (оптичка патека на киветата 1 cm) на бранова должина од 765 nm. Концентрацијата на вкупните феноли беше изразена во еквиваленти на гална киселина (mg/L гална киселина).

### **3.5.2. Определување на вкупни антоцијани**

Вкупните антоцијани беа определени со метод предложен од Di Stefano и неговите соработници (1989). Вината беа разредени (1:10) со раствор од етанол/вода/HCl во однос 69/30/1 (v/v/v). Апсорбанцата беше измерена на бранова должина од 540 nm, а содржината на вкупните антоцијани беше пресметана со помош на следната равенка:

$$TA = A_{(540nm)} \cdot 16,7 \cdot d$$

TA-вкупни антоцијани,  $A_{540}$  = Апсорбанца на 540 nm, d-разредување.

Резултатите беа изразени како еквиваленти на малвидин-3-глукозид (mg/L).

### **3.5.3. Определување на интензитет на боја и нијанса**

Интензитет на боја (ИБ) и нијанса (Н) беа определени со директно мерење на апсорбанцата на вино на бранови должини од 420 nm, 520 nm и 620 nm, со кварцна кивета со должина на оптичка патека од 2 mm (Glories, 1984).

Интензитетот на бојата е збир од апсорбанците на 420, 520 и 620 nm додека нијансата се определува како однос на апсорбанците на 420 nm и 520 nm. Пресметувањето на интензитетот на бојата и нијансата беше извршено според равенките:

$$ИБ = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

$$Н = A_{420}/A_{520}$$

Добиените вредности за апсорбанците на 420 nm, 520 nm и 620 nm беа искористени за определување на уделот на црвената боја (% Цр), уделот на жолтата боја (% Жл), уделот на сината боја (% Си), како и за определување на сјајноста на виното (dA %). Пресметувањето на составот на бојата беше направена со следните равенки:

$$\% \text{ Жл} = A_{420} / ИБ \cdot 100$$

$$\% \text{ Цр} = A_{520} / \text{ИБ} \cdot 100$$

$$\% \text{ Си} = A_{620} / \text{ИБ} \cdot 100$$

$$dA (\%) = [1 - (A_{420} + A_{620} / 2 \cdot A_{520})] \cdot 100$$

### 3.5.4. Определување на железо

За определување на железо беа користени комерцијални китови за колориметриско определување (Enzytec *Color IRON Ferene-S* r-Biopharm Darmstadt Germany). Методата се базира на реакција на редукција на  $\text{Fe}^{3+}$  јоните до  $\text{Fe}^{2+}$  со помош на аскорбинска киселина и додавање на реагенс за обојување FERENE-S (3-(2-пиридил)-5,6-бис(2-(5-фурил сулфонска киселина)-1,2,4-триазин, натриумова сол монохидрат) при што се добива сино обоен стабилен комплекс. Интензитетот на обојувањето беше мерен во семимикро пластична кивета од 10 mm, на бранова должина од 582 nm. Најпрво беа поставени три семимикро кивети. Во секоја од нив беше додадено по 1680  $\mu\text{L}$  од реагенсот 1 (раствор на аскорбинска киселина со концентрација 0,1 mol·dm<sup>-3</sup>). Потоа, во првата кивета беше додано 100  $\mu\text{L}$  дестилирана вода, во втората 100  $\mu\text{L}$  од реагенсот 2 (стандарден раствор на железо во форма на  $\text{FeSO}_4$  со концентрација 20 mg/L). Во третата кивета беше додадено 100  $\mu\text{L}$  вино. Потоа, беа отчитани апсорбанците на бранова должина од 582 nm и добиените апсорбанци од трите кивети беа одбележани со A1Blank, A1Stand и A1Sample. Во секоја кивета потоа беше додадено по 320  $\mu\text{L}$  реагенс 3 (FERENE-S), и по 10 min беше измерена апсорбанцата на бранова должина од 582 nm и измерените апсорбанци беа одбележани со A2Blank, A2Stand и A2Sample. Пресметувањето на содржината на железо беше извршена на следниот начин:

$$\Delta A = (A_2 - df \times A_1)_{\text{sample/standard}} - (A_2 - df \times A_1)_{\text{blank}}$$

$$C_{\text{sample}} [\text{mg/L}] = \Delta A_{\text{sample}} / \Delta A_{\text{standard}} \times 20 \text{ mg/L}$$

df – фактор на разредување и изнесува 0,848

### 3.5.5. Определување на бакар

За определување на бакар беа користени готови китови за колориметриско определување (Enzytec Color IRON Ferene-S r-Biopharm Darmstadt Germany). Бакарот од пробата реагира со реагенс Di-PAESA (4-(3,5-дибромо-2-пиридилазо)-N-етил-N-сулфопропиланилин натриумова сол) во кисела средина при што се добива виолетово обоен стабилен комплекс чија боја е пропорционална со содржината на бакарот во пробата. Интензитетот на обојување беше мерен на бранова должина од 580 nm. Најпрво беа поставени три семимикро кивети и во секоја од нив беше додадено по 2000  $\mu\text{L}$  реагенс 1 (пуферен раствор pH 4,9). Во првата кивета беше додадено 200  $\mu\text{L}$  дестилирана вода, во втората 200  $\mu\text{L}$  реагенс 2 (стандарден раствор бакар во форма на  $\text{CuSO}_4$  со концентрација 5 mg/L) и во третата кивета е додадено 200  $\mu\text{L}$  вино. Апсорбанците на растворите во трите кивети беа измерени на бранова должина од 580 nm и одбележани A1Blank, A1Stand и A1Sample. Потоа, во секоја од трите кивети беше додадено по 500  $\mu\text{L}$  реагенс 3 (DiBr-PAESA). По стоење од 10 min, беа измерени апсорбанците на растворите во трите кивети и одбележани со A2Blank, A2Stand и A2Sample. Содржината на бакар беше пресметана на следниот начин:

$$\Delta A = (A2 - df \times A1)_{\text{standard/sample}} - (A2 - df \times A1)_{\text{blank}}$$

$$C_{\text{sample}} [\text{mg/L}] = \Delta A_{\text{sample}} / \Delta A_{\text{standard}} \times 5 \text{ mg/L}$$

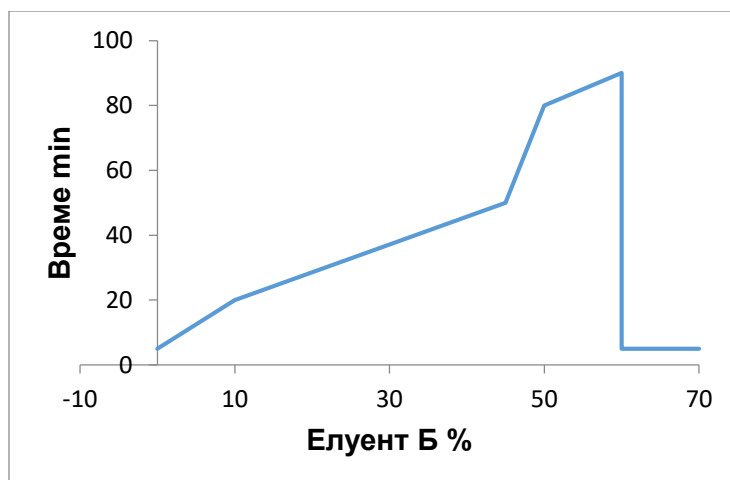
df – фактор на разредување кој изнесува 0,815

### 3.6. UPLC-QTOF-MS анализа

Идентификација и семиквантификација на фенолните компоненти во вината беше извршена со Agilent 1290 UHPLC инструмент за ултрависокоефикасна течна хроматографија (UPLC-Ultra Hightperformance Liquid Chromatografy) (Agilent Technologies) кој содржи бинарна пумпа 1290 (infinity G4220A), систем за автоматско земање на примероци 1290 G4226A и детектор DAD VL Agilent 1260 G1315 (Agilent Technologies), поврзан со Agilent 6530 QTOF/MS (Agilent Technologies,). Разделувањето на компонентите беше извршено на колона CORTEX UPLC C18 (2,1 x 150 mm; 1,6  $\mu\text{m}$ ) на температура од 40 °C и проток на мобилна фаза од 0,3 mL/min. Беше применета повеќестепена градиентна метода, со мобилна фаза за елуирање: раствор А беше 1 % (v/v) оцетна киселина во вода, и раствор Б 1% (v/v) оцетна киселина во метанол. Односот на менување на растворот Б во текот на елуирањето беше следен: 0-10 min 5-20%, 10-45 min 20-50%, 45-50 min 50-80%, 50-60 min 80-90%. Графички градиентното елуирање е прикажано на слика 23. Волуменот на инјектираниот примерок беше 2  $\mu\text{L}$ . Пред инјектирање во UPLC системот, вината беа филтрирани со филтер со дијаметар на честички 0,22  $\mu\text{m}$  (BIO PTFE Syringe Filter, 13 mm, 0,22  $\mu\text{m}$ ).

MS условите за определување на полифенолните компоненти беа оптимизирани на Agilent 6530 QTOF-MS спектрометар. Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis B.04.00 беше користен за контрола на инструментот и обработка на резултатите. Применети беа следните параметри: температура на гасот 300 °C, гас за сушење 5 L/min, небулизатор 25 psi, температура на гасот на обвивката 300 °C, проток на гасот на обвивката 11 L/min, фрагментатор 90 V, скимер 65 V и напон на капиларата 3000 V. Опсегот на скенирање на маса/полнеж ( $m/z$ ) беше 100-800, брзината на скенирање 2 спектри/s. Сите полифенолни компоненти во примероците вино беа идентификувани според нивните масени спектри. Определено беше и нивното ретенционо време.





Слика 23. Градиент на елуирање. Елуент А: 1 % (v/v) оцетна киселина во вода. Елуент Б: 1% (v/v) оцетна киселина во метанол

Figure 23. Gradient elution. Eluent A: 1 % (v/v) acetic acid in water. Eluent B: 1% (v/v) acetic acid in methanol

Екстрахираните јонски хроматограми на идентификуваните компоненти беа пресметани со сумирање на интензитетите на нивните специфични маси во масениот спектар. Интензитетите на јоните се екстрахирани на ниво однос маса полнеж ( $m/z$ ) на молекуларните  $M^+$  и на квази-молекуларни ( $[M-H]^-$ ,  $[M+H]^+$ ) јони на детектираните компоненти.

### 3.6.1. Валидациони параметри

За конструирање на калибрациони криви користени се 9 фенолни компоненти (гална киселина, ферулна киселина, *p*-кумарна киселина, 3,4-дихидроксибензоева киселина, кафена киселина, сирингинска киселина, рутин, кверцетин и *trans*-ресвератрол). Од секоја полифенолна компонента беше подготвен раствор со концентрација од 500  $\mu\text{g/mL}$ , соодветно. Како растворувач беше користен чист метанол. Сите девет раствори беа чувани на ладно и темно место (температура до 4 °C). беше подготвена смеса (Stock solution) со концентрација 40  $\mu\text{g/mL}$  со мешање на еднакви волумени од растворите со концентрација 500  $\mu\text{g/mL}$  (волумен од 2 mL

од секој раствор со концентрација 500 µg/mL беше ставен во одмерна колба од 25 mL и колбата беше дополнета со метанол до марката). Од оваа смеса беа направени шест разредувања при што се добија раствори со следните концентрации: 0,62 µg/mL, 1,2 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL и 20 µg/mL. Разредувањето беше направено со елуентот Б. Со овие стандардни раствори беа конструирани калибрациони криви во шест точки во опсег од 0,62 µg/mL до 20 µg/mL користејќи ја површината под соодветниот пик на екстрахираните јонски хроматограми.

Беа определени податоците за линеарноста како што се наклон, отсечок, регресиона права и коефициент на корелација ( $R^2$ ). Беше определена и границата на детекција LOD (Limit of detection) и граница на квантификација LOQ (Limit of quantification). Исто така, беа определени и линеарноста, повторливост и репродуцибилност. Детален опис на овие параметри е дадено во поглавје 4.

### **3.6.2. Статистичка анализа**

Сите вина беа анализирани со три повторувања ( $n=3$ ). Резултатите беа статистички третираны при што беше пресметана стандардната девијација (SD) како и релативната стандардна девијација (RSD). За ова беше користен софтвер STATISTICA 6.0 (Stat Soft Inc., USA). Резултатите за релативната стандардна девијација помали од 20 % се сметаа за задоволителни.

## 4. Резултати и дискусија

### 4.1. Основни хемиски параметри на виното

Основните хемиски параметри кои се важни за квалитетот на виното се: алкохол, екстракт, вкупни киселини, испарливи киселини, рН, редуцирачки шеќери, слободен и вкупен SO<sub>2</sub>. Овие параметри беа определени на испитуваните примероци вино од сортите Вранец и Мерло добиени со трите различни типови на ферментатори. Резултатите за основните параметри на вината се прикажани во табела 4.

Според содржината на шеќер во грозјето/ширата, може приближно да се пресмета содржината на алкохол која што се очекува да се создаде во текот на ферментацијата. Така, од шира со 180 g/L шеќер треба да се добие вино со околу 10 % алкохол (V/V). Од добиените резултати беше заклучено дека содржината на алкохол во анализираниите примероци вино од двете сорти се движи во граници од 12,08 до 12,4 % (средна вредност 12,23 %). При тоа, вината од двете сорти добиени со рото ферментација имаат најниска вредност, додека највисока вредност за содржината на алкохол беше измерена за виното Вранец добиено со класична метода на ферментација (В-К) и виното Мерло добиено со методата на потиснување (М-П). Генерално, вината од сортата Вранец содржеа повеќе алкохол во однос на вината Мерло, без разлика на типот на применетата ферментација бидејќи грозјето Вранец имаше повисока содржина на редуцирачки шеќери во однос на грозјето до сортата Мерло (24,5 °Brix во грозјето од сортата Вранец и 22,9 °Brix во грозјето од сортата Мерло).

Табела 4 . Основни хемиски параметри

Table 4. Basic chemical parameters

Вино	В-К	В-Р	В-П	М-К	М-Р	М-П	С.В	Min	Max
Алкохол (%)	12,40	12,28	12,36	12,10	12,08	12,16	12,23	12,08	12,40
Екстракт (g/L)	40	45	40	39	44	39	41	39	45
Специфична тежина	0,9957	0,9956	0,9959	0,9946	0,9946	0,9951	0,9952	0,9946	0,9957
Редуцирачки шеќери	2,7	2,4	2,6	2,2	2,5	2,4	2,4	2,2	2,7
Вкупни киселини (g/L)*	6,1	6,3	6,2	5,9	6,0	5,8	6,0	5,8	6,3
Испарливи киселини (g/L)**	0,44	0,44	0,42	0,45	0,41	0,44	0,43	0,41	0,45
pH	3,3	3,4	3,4	3,2	3,2	3,3	3,3	3,2	3,4
Слободен SO <sub>2</sub> (mg/L)	42	44	40	42	44	39	41	39	44
Вкупен SO <sub>2</sub> (mg/L)	98	89	92	102	87	94	93	87	102

В-К: вино Вранец добиено со класична ферментација, В-Р: вино Вранец добиено со рото метода, В-П: вино Вранец добиено со punchdown метода, М-К: вино Мерло добиено со класична метода, М-Р: вино Мерло добиено со рото метода, М-П: вино Мерло добиено со punchdown метода. С.В: Средна вредност, Min: Минимална вредност, Max: Максимална вредност.

\*Вкупни киселини изразени како g/L винска киселина

\*\*Испарливи киселини изразени како g/L оцетна киселина

Екстрактот на виното го сочинуваат неиспарливите растворливи компоненти, вклучувајќи шеќери, неиспарливи киселини, глицерол, 2,3-бутил гликол, феноли. Во ова истражување, вината од двете сорти презентираа високи вредности на екстракт, во граници од 39 до 45 g/L што укажува на фактот дека се работи за богати и структурни вина. Во однос на влијанието на типот на ферментација, вината добиени со рото ферментација имаат највисока содржина на екстракт, без разлика на сортата, додека вината добиени со класична ферментација и потиснување имаат пониски вредности за екстрактот. Всушност, со рото методата се постигнува поголема екстракција на неиспарливите компоненти од грозјето во виното со што се потврдува дека со овој тип на ферментатор се добиваат најкомплексни и структурни вина, а со тоа и постабилни и побогати вина.

Во однос на специфичната тежина на вината, беа добиени вредности во граници од 0,9946 до 0,9959. Овие вредности се очекувани за црвени вина, согласно содржината на алкохол и сувиот екстракт.

Главни јаглехидрати во грозје се глюкоза и фруктоза, кои обично се нарекуваат и „редуцирачки шеќери“. Содржината на шеќери во грозјето зависи од сортата, зрелоста, здравствената состојба на грозјето и условите на одгледување. За време на алкохолната ферментација, содржината на шеќери се намалува како резултат на нивното претворање во етил алкохол, при што најчесто се добиваат суви вина со ниска содржина на шеќер ( $< 5 \text{ g/L}$ ) (O.I.V., 2021 Anex A). Во ова истражување беше утврдено дека анализираните примероци вино имаат ниска содржина на редуцирачки шеќери во граници од 2,2 g/L (M-K) до 2,7 g/L (B-K), што значи дека сите вина се суви и кај сите ферментацијата завршила успешно.

Од голема важност е да се прави разлика помеѓу неколкуте типови на киселост на виното: вкупна киселост, рН и испарлива киселост, бидејќи сите тие влијаат на сензорните карактеристики на виното. Вкупната киселост претставува збир од „неиспарлива и испарлива киселост“, и ги вклучува сите видови на киселини, како фосфорна киселина, органски киселини (винска, јаболкова и лимонска), како и аминокиселини чие што влијание на вкупната киселост сеуште не е добро познато. Од сите киселини, винската киселина е доминантна компонента во шира и вино, присутна во форма на калиумова сол. Поради тоа, вкупната

киселост на виното се изразува во еквиваленти на винска киселина. Од табела 3 може да се забележи дека вредностите за концентрацијата на вкупните киселини во сите анализирани вина се движи во граници од 5,8 до 6,3 g/L. Овие вредности се доволни за да се обезбеди микробиолошка стабилност на вината како и доволно оптимална свежина. Црвените вина се стабилни и при помала киселост поради присуството на феноли кои ја засилуваат киселоста и овозможуваат стабилност на вината во текот на зреењето. Имајќи го предвид влијанието на ферментацијата, вината добиени со рото метода презентираа малку повисоки вредности на вкупна киселост во однос на вината добиени со класична ферментација и ферментација на потиснување.

Вредноста на рН кај анализираните вина беше во граници од 3,2 до 3,4 кои се очекувани и вообичаени за црвени вина.

Испарливите киселини во виното претставуваат многу значаен физичко-хемиски параметар, којшто треба да се следи во текот на процесот на производство на вино. Зголемените испарливи киселини во виното негативно влијаат на неговите органолептички карактеристики, како и на неговиот квалитет во целост. Појавата на зголемена содржина на испарливи киселини е поврзана со процесот на формирање на оцетна киселина во релативно висока концентрација (Ribereau et al., 1979). Сите вина, без разлика на сортата и типот на ферментација, содржеа испарлива киселост во граници од 0,41 до 0,45 g/L. Овие вредности се очекувани со оглед на фактот дека ферментацијата беше цело време контролирана и содржината на додаден SO<sub>2</sub> во вината била доволна за да ги заштити вината од оксидација, а воедно и од создавање на повисока концентрација на оцетна киселина. Содржината на оцетна киселина е параметар кој законски се контролира и затоа е неопходно постојано и редовно следење во текот на производството. Максимално дозволена содржина на испарлива киселост изнесува 1,2 g/L оцетна киселина за црвени вина (O.I.V., 2021 Anex A), (Official Gazette of the Republic of Macedonia, No 16, 2012). Доколку испарливите киселини се присутни во концентрација повисока од 1 g/L, тогаш тие негативно влијаат на вкусот и мирисот на виното, односно на квалитетот на виното, давајќи му на виното непријатен мирис на оцет.

Сулфур диоксид во вината се додава поради микробиолошка и антиоксидантна заштита. Употребата на  $\text{SO}_2$  во производството на вино се должи на неговата способност да делува како ефикасен антиоксидант и антимицробен агенс.  $\text{SO}_2$  ги спречува процесите на оксидација и има способност за белење на пигменти како и способност за елиминација на непријатни мириси во виното.  $\text{SO}_2$  може селективно да делува против дивите квасци кои потекнуваат од лушпата на грозјето и да ја блокира нивната активност. Сулфур диоксидот може да се додава во виното како раствор (5 % раствор на сулфуреста киселина), а може и како сол калиум метабисулфид ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) кој се јонизира во кисела средина ослободувајќи гасовит  $\text{SO}_2$  (Wilson et al., 1943; Ivanova-Petropulos & Mitrev, 2014). Во ова истражување, содржината на слободен  $\text{SO}_2$  се движи во граници од 39 до 44 mg/L, додека содржината на вкупен  $\text{SO}_2$  во граници од 87 до 102 mg/L, што е доволна содржина на  $\text{SO}_2$  за вината да бидат заштитени од оксидација.

Од особено значење за производството на вино е и разбирањето на односот помеѓу pH и  $\text{SO}_2$ . Ефективноста на антимицробната активност на  $\text{SO}_2$  зависи од pH на виното. Колку pH на виното е повисока толку помалку  $\text{SO}_2$  ќе биде во корисна слободна форма. Затоа, од голема важност е вината да имаат пониска вредност на pH и повисока содржина на вкупни киселини, бидејќи на тој начин се постигнува микробиолошка и хемиска стабилност на виното. Доколку  $\text{SO}_2$  се додаде во повисока концентрација, предизвикува непријатен остар мирис на  $\text{SO}_2$  и зајакнување на металниот вкус во устата, што има негативни ефекти врз органолептичките карактеристики на виното, а со тоа и на квалитетот на виното.

## 4.2. Резултати од спектрофотометриски анализи

### - *Вкупни феноли, вкупни антоцијани, интензитет на боја, нијанса, состав на боја и сјајност*

Анализите на вкупни феноли, антоцијани, интензитет на боја, нијанса, состав на боја и сјајност во вината од сортите Вранец и Мерло добиени со класична ферментација, рото ферментација и ферментација со потиснување, беа извршени со примена на спектрофотометриски методи со цел да се проучи влијанието на методата на ферментација врз содржината на сите овие параметри, како и со цел да се утврди најдобрата винификациона техника со која се добиваат најструктурни вина, со висока содржина на полифеноли. Резултатите од спектрофотометриските анализи се прикажани во табела 5.

Вината беа произведени со класична метода на ферментација и мацерација, рото метода и метода на потиснување со цел да се проучи влијанието на винификационата техника врз екстракцијата на полифеноли. При тоа, беше заклучено дека најмногу вкупни феноли, антоцијани, интензитет на боја и нијанса се добиени кај вината добиени со рото ферментација (за Вранец: 3220 mg/L вкупни феноли, 820 mg/L вкупни антоцијани, интензитет на боја 2,26 и нијанса 0,36, и за Мерло: 3020 mg/L вкупни феноли, 762 mg/L вкупни антоцијани, интензитет на боја 2,21 и нијанса 0,29). Со рото ферментаторот, како резултат на процесот на ротација, се постигнува рамномерно и континуирано мешање на ширата со цврстите делови од грозјето (семки и лушпи) долж површината на целиот ферментатор, а тоа овозможува најдобра екстракција на полифеноли. Содржината на полифеноли е во линеарна корелација со содржината на антоцијани. Вината со најмногу антоцијани, имаат најголем интензитет на боја и нијанса, бидејќи бојата на вината е определена од присуството на антоцијани во виното.



Табела 5. Вкупни феноли, вкупни антоцијани, интензитет на боја (ИБ) и нијанса (Н)

Table 5. Total phenols, total anthocyanins, color intensity (CI) and hue (H)

Вино	ВФ*	ВА**	ИБ	Н
В-К	2350 ± 3,1	572 ± 2,6	2,21 ± 0,02	0,32 ± 1,1
В-Р	3220 ± 2,1	820 ± 1,1	2,26 ± 0,01	0,36 ± 1,4
В-П	2987 ± 7,5	742 ± 1,5	2,23 ± 0,03	0,29 ± 2,0
<b>Средна вредност</b>	<b>2852</b>	<b>711</b>	<b>2,23</b>	<b>0,32</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>2350</b>	<b>572</b>	<b>2,21</b>	<b>0,29</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>3220</b>	<b>820</b>	<b>2,26</b>	<b>0,36</b>
М-К	2010 ± 4,6	580 ± 2,1	2,01 ± 0,01	0,25 ± 1,8
М-Р	3020 ± 2,8	762 ± 2,6	2,21 ± 0,02	0,29 ± 1,4
М-П	2762 ± 5,0	666 ± 4,5	2,17 ± 0,01	0,22 ± 2,2
<b>Средна вредност</b>	<b>2597</b>	<b>669</b>	<b>2,13</b>	<b>0,25</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>2010</b>	<b>580</b>	<b>2,01</b>	<b>0,22</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>3020</b>	<b>666</b>	<b>2,21</b>	<b>0,29</b>

Ознаки: ВФ-вкупни феноли; ВА-вкупни антоцијани; ИБ-интензитет на боја –  $A_{420} + A_{520} + A_{620}$ ; Н-нијанса =  $A_{420}/A_{520}$

В-К: вино Вранец добиено со класична метода, В-Р: вино Вранец добиено со рото метода, В-П: вино Вранец добиено со punchdown метода, М-К: вино Мерло добиено со класична метода, М-Р: вино Мерло добиено со рото метода, М-П: вино Мерло добиено со punchdown метода.

Резултатите се средни вредности од три повторувања ± SD (стандардна девијација)

\*Концентрација изразена како еквиваленти гална киселина (mg/L)

\*\*Концентрација изразена како еквиваленти малвидин-3-глукозид (mg/L)

Споредено со други вина од Македонија (Ivanova et al., 2009, Ivanova et al., 2010,) добиените вина во ова истражување се богати со полифеноли. Споредувајќи ги сортите, вината Вранец имаат повисока содржина на вкупни феноли (2852 mg/L средна вредност), вкупни антоцијани (711 mg/L средна вредност), интензитет на боја (2,23 средна вредност) и нијанса (0,32 средна вредност), во споредба со вината Мерло (средни вредности за вкупни феноли, антоцијани, нијанска на боја и интензитет: 2597 mg/L, 669 mg/L, 2,13 и 0,25, соодветно), без разлика на применетата метода на ферментација. Причината за тоа е генетската разлика меѓу двете сорти. Сортата Вранец генерално се вбројува во сорта која е интензивно обоена и е побогата со полифеноли, што е потврдено и во ова истражување и во други претходни истражувања (Ivanova et al., 2011). Содржината на фенолни компоненти зависи и од климатските и почвените карактеристики на виногорјето каде се одгледува виновата лоза (Seguin, 1986).

Интензитетот на бојата се дефинира како збир од апсорбациите на 420, 520 и 620 nm и ја дава содржината на боја во виното. Во ова истражување измерени се високи вредности за ИБ, кои се движат во граници од 39,4 до 46,2.

Ниски вредности за нијансата (0,2-0,7) се карактеристични за млади црвени вина, како што и беа измерени во ова истражување. Вредностите за нијанса се движат во граници од 0,22 до 0,36 за двете сорти, со што се потврдува дека се работи за млади вина. Нијансата на виното е параметар кој многу зависи од староста на виното. Притоа, со стареење се намалува апсорпцијата на 520 nm, а се зголемува апсорпцијата на 420 nm, како резултат на оксидативни процеси и преминување на црвената боја во портокалови нијанси (Ivanova et al., 2014). Со стареењето, вредностите на нијансата на вино постепено се зголемуваат.

Дополнително, беа пресметани вредностите за составот на боја (жолта, црвена и сина) и сјајност (dA) на вината од двете сорти Вранец и Мерло добиени со различни методи на ферментација и резултатите се прикажани во табела 6. Вредностите за сјајност на виното се движат во граници од 44,4 % средна вредност за виното Мерло до 45,3 % средна вредност за виното Вранец, што укажува на фактот дека се работи за вина со темно црвена боја. Највисока вредности за овој

параметар се пресметани за виното Вранец добиено со рото ферментација (В-Р) (47,6 %), кое има и најголем процент на црвена боја (49,1 %), проследено со виното Мерло добиено со рото ферментација (М-Р) (46,3 %) и процент на црвена боја (48,4 %). Виното В-Р има највисок процент на црвени и сини пигменти, иако вредностите за сите пигменти се слични кај сите анализирани вина. Генерално, вината од двете сорти Вранец и Мерло произведени со рото метода имаат најинтензивна темно црвена боја.

Резултатите за вкупни феноли, вкупни антоцијани, интензитет на боја и нијанса, како и вредностите за уделот на обоените пигменти и сјајноста потврдуваат дека рото методата е најефикасна за екстракција на полифенолните и обоените компоненти од грозјето во виното.

Табела 6. Состав на боја и сјајност на вина

Table 6. Color composition of the analyzed wine samples expressed in %

Вино	Жолти пигменти (%)	Црвени пигменти (%)	Сини пигменти (%)	dA (%)
<b>В-К</b>	41,6 ± 0,05	46,7 ± 0,06	13,2 ± 0,05	42,2 ± 0,05
<b>В-Р</b>	39,9 ± 0,01	49,1 ± 0,05	12,4 ± 0,02	47,6 ± 0,01
<b>В-П</b>	40,4 ± 0,05	48,9 ± 0,05	12,7 ± 0,01	46,1 ± 0,05
<b>Средна вредност</b>	<b>40,6</b>	<b>48,2</b>	<b>12,7</b>	<b>45,3</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>39,9</b>	<b>46,7</b>	<b>12,4</b>	<b>47,6</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>41,6</b>	<b>49,1</b>	<b>13,2</b>	<b>42,2</b>
<b>М-К</b>	42,7 ± 0,05	46,8 ± 0,01	11,7 ± 0,06	42,7 ± 0,02
<b>М-Р</b>	41,7 ± 0,02	48,4 ± 0,05	11,0 ± 0,01	46,3 ± 0,01
<b>М-П</b>	42,2 ± 0,01	47,5 ± 0,05	11,4 ± 0,01	44,3 ± 0,02
<b>Средна вредност</b>	<b>42,2</b>	<b>47,5</b>	<b>11,3</b>	<b>44,4</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>41,7</b>	<b>46,8</b>	<b>11,0</b>	<b>42,7</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>42,7</b>	<b>48,4</b>	<b>11,7</b>	<b>46,3</b>

$dA$  – сјајност на вино =  $(1 - A_{420} + A_{620} / 2 \cdot A_{520}) \cdot 100$

Резултатите се средни вредности од три повторувања ± SD (стандардна девијација).

В-К: вино Вранец добиено со класична метода, В-Р: вино Вранец добиено со рото метода, В-П: вино Вранец добиено со punchdown метода, М-К: вино Мерло добиено со класична метода, М-Р: вино Мерло добиено со рото метода, М-П: вино Мерло добиено со punchdown метода

## Бакар и железо

За определување на содржина на бакар и железо беа применети спектрофотометриски методи за анализа на вината Вранец и Мерло произведени со трите различни методи на ферментација. Мерењата беа изведени со цел да се проучи влијанието на техниката на ферментација врз содржината на овие два елементи. Резултатите за концентрација на Cu и Fe во вината се прикажани во табела 7.

Табела 7. Содржина на железо и бакар

Table 7. Iron and copper content

Вино	Fe (mg/L)	Cu (mg/L)
В-К	2,6 ± 0,06	0,3 ± 0,01
В-Р	3,1 ± 0,05	0,4 ± 0,02
В-П	2,8 ± 0,01	0,2 ± 0,01
Средна вредност	2,8	0,3
Минимална вредност	2,6	0,2
Максимална вредност	3,1	0,4
М-К	3,8 ± 0,01	0,8 ± 0,02
М-Р	4,7 ± 0,02	0,9 ± 0,01
М-П	3,3 ± 0,01	0,6 ± 0,01
Средна вредност	3,9	0,7
Минимална вредност	3,3	0,6
Максимална вредност	4,7	0,9

Резултатите се средни вредности од три повторувања ± SD (стандардна девијација)

В-К: вино Вранец добиено со класична ферментација, В-Р: вино Вранец добиено со рото метода, В-П: вино Вранец добиено со punchdown метода, М-К: вино Мерло добиено со класична метода, М-Р: вино Мерло добиено со рото метода, М-П: вино Мерло добиено со punchdown метод.

В; М; кратенка за сорта на вино: В-Вранец, М-Мерло

Елементите железо и бакар се природно присутни во грозјето. Во мали концентрации, железото има важна улога како активатор на ензимите во грозјето, како стабилизатор во виното, а се јавува и како функционална компонента на протеините (Diruy et al., 1995). Во повисоки концентрации, железото има улога на менување на оксидационо-редукциониот потенцијал на виното, влијае негативно на сетилните карактеристики и учествува во формирање на комплекси со танините и фосфатите што доведува до појава на талог и нестабилност на виното. Содржината на железо во грозјето е во опсегот од 1 до 5 mg/L (Cook et al., 1995; Bora et al., 2022). Зголемената содржина на железо во виното најчесто потекнува од кородирана и

неисправна опрема и садови за чување на виното. Во ова истражување овој причинител е намален на минимум бидејќи беше користена опрема и садови направени од иноксен материјал. Иако железото во мали концентрации игра важна улога во метаболичките процеси на квасците, во содржина повисока од 20 mg/L предизвикува инхибирање на процесот на ферментација. Клеточната површина на квасецот има нето-негативен полнеж кој може брзо да се поврзе со  $Fe^{2+}$  јоните и на тој начин да се предизвика инхибирање на активноста на квасецот (Thoukis & Amerine, 1956). Поголем дел од железото во виното е присутно како двовалентен катјон  $Fe^{2+}$ . Односот на  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$  зависи од степенот на оксидативните процеси во виното. Доколку се појават услови за оксидација,  $Fe^{2+}$  се оксидира до  $Fe^{3+}$ . Формираните  $Fe^{3+}$  јони лесно стапуваат во реакција со фосфатите кои се природно присутни во виното во концентрации од 135 до 200 mg/L при што се формира талог или заматување од  $FePO_4$  (Chow & Gump, 1987). Додавањето на диамониум фосфат како нутриент во процесот на ферментацијата исто така ја зголемува содржината на фосфатните анјони, а со тоа и на формираните  $FePO_4$ . Железото може да стапува во реакции на комплексирање и со некои органски киселини во виното, и на тој начин станува неактивно во понатамошните реакции со фосфатните анјони. Кога содржината на железо во виното надминува 5 mg/L, некои производители додаваат лимонска киселина во концентрации од 12 до 24 g/hL со цел инхибирање на активноста на железните јони. Во нашето истражување, содржината на железо во истражуваниите вина беше многу ниска и се движеше во опсег од 2,6 до 4,7 mg/L (табела 7). При тоа, вината од сортата Вранец имаат пониска содржина на железо (2,83 mg/L средна вредност) во однос на вината од сортата Мерло (3,9 mg/L средна вредност). Во однос на влијанието на ферментацијата, беше заклучено дека вината добиени со рото ферментација имаат највисока содржина на железо (3,1 mg/L за виното В-Р и 4,7 mg/L за виното М-Р).

Бакарот во мали концентрации е важен неоргански катализатор кој учествува во метаболичките процеси на микроорганизмите. Во концентрации повисоки од 1 mg/L, бакарот може сетилно да се забележи и учествува во процесите на оксидација на фенолите во виното (Amerine & Ough, 1974; Hopfer et al., 2015). Доколку содржината на бакар надмине 9 mg/L тој станува метаболички токсин кој го

попречува или забавува процесот на ферментација (Suomalainen & Oura, 1971). Бакарот во виното може да потекнува од средствата за заштита на виновата лоза, опремата која се користи во винарската визба, како и од употреба на бакарни соли во некои процеси за корекција на вината. Зголемената содржина на бакар кај црвените вина може да предизвика формирање на кафеав талог од  $\text{CuO}$  кој е нерастворлив во вода и алкохол, паѓа како талог и предизвикува процес на нестабилност на виното (Blesic et al., 2017). Од табела 7 се гледа дека содржината на бакар во испитуваните примероци на вино од сортите Вранец и Мерло е многу ниска и е во опсег од 0,2 до 0,9 mg/L. И овој елемент, слично како железото, е присутно во повисока концентрација во вината од сортата Мерло (0,7 mg/L средна вредност) во однос на вината од сортата Вранец (0,3 mg/L средна вредност). Во однос на влијанието на ферментацијата, највисока концентрација на бакар има во вината добиени со рото ферментација (В-Р: 0,4 mg/L, М-Р: 0,9 mg/L), проследено со вината произведени со класична ферментација (В-К: 0,3 mg/L, М-К: 0,8 mg/L), а најниска е кај вината добиени со метода на потиснување (В-П: 0,2 mg/L, М-П: 0,6 mg/L). Највисока содржина на бакар во вината Вранец и Мерло добиени со рото метода на ферментација е како резултат на тоа што кај рото ферментаторите контактната површина помеѓу лушпите и семките од грозјето со ширата во текот на ферментацијата е најголема, а со тоа и екстракцијата на бакарот во виното е повисока.

Генерално, содржина на Fe и Cu во вината од сортата Мерло е повисока од онаа кај вината од сортата Вранец бидејќи виновата лоза од сортата Мерло беше третирана со хемиски препарати за заштита кои содржат бакарни соли (смеса од  $\text{CuSO}_4/\text{CaO}$ , како и различни формулации на ѓубрива (течни минерални ѓубрива, минерални ѓубрива и биостимулатори за подобрување на својствата на почвата кои во себе содржат микро и макро елементи меѓу кои и бакар и железо). Овие податоци за употребата на средства за заштита и потхранување на лозата беа добиени директно од лозаропроизводителите на сортата Мерло (с. Ерцелија-Овчеполски Виногорје).

Генерално, сите произведени вина имаат содржина на Fe и Cu кои се пониски од максимално дозволените содржини, односно пониски од 5 mg/L за Fe и пониски

од 1 mg/L за Cu (O.I.V., 2021 Анекс С). Тоа значи дека произведените вина се стабилни, не се токсични по здравјето на консументите и дека во процесот на производство е користена исправна и одржувана опрема.

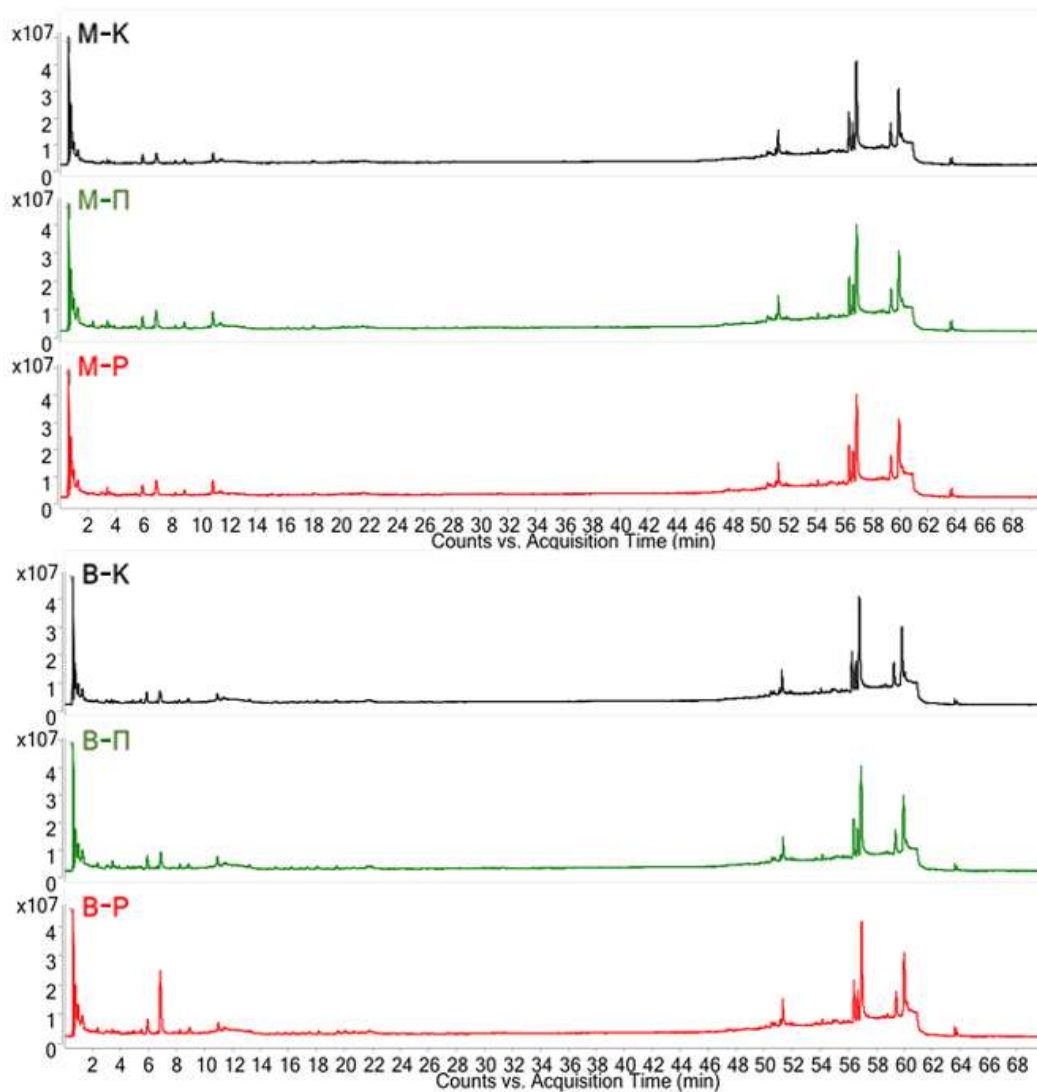
#### 4.3. UPLC-QTOF-MS анализа на полифеноли во вина

Определувањето на полифенолниот состав на примероците вино од сортите Вранец и Мерло, добиени со три типа на ферментација, беше извршено со ултраефикасна течна хроматографија поврзана со масен спектрометар со квадрупол масен анализатор со време на прелетување (UPLC-QTOF-MS). При тоа, користено е градиентно елуирање со 1 % оцетна киселина во мобилната фаза, со рН 2,6 (Ivanova et al., 2011). Со оваа мобилна фаза не се постигнува сепарација на поединечни полифеноли во вината, за што е потребна кисела мобилна фаза со ниска вредност на рН (помеѓу 1 и 2). Ова е особено важно за разделување на антоцијани бидејќи тие постојат во црвена катјонска форма само при ниска вредност на рН (околу 95 % при рН 1,5) (Ivanova et al., 2011). Меѓутоа, главен недостаток на примената на мобилна фаза со ниската вредност на рН е тоа што се намалува одговорот на карбоксилните групи во масениот спектар (Jemal et al., 1998, Ivanova et al., 2011). Ниска вредност на рН го скратува и животот на колоната, а кога се применува масен детектор, не е ни потребно да се постигне целосно разделување на поединечни компоненти. Имајќи ги предвид овие факти, беше избрана мобилна фаза која содржи 1 % оцетна киселина и рН 2,6 и под овие услови беше постигнато разделување на пиковите на безбојните компоненти. Антоцијаните (моноглукозиди, ацетилглукозиди, *p*-кумароилглукозиди и *p*-кафеоилглукозиди) и другите пигменти ко-елуираат. За нивна квантитативна евалуација, беа пресметани релативните содржини на различни соединенија според нивните различни маси користејќи екстрахирани јонски хроматограми карактеристични за соодветни фенолни компоненти.



#### **4.3.1. MS идентификација на фенолни соединенија во вина од сортите Вранец и Мерло**

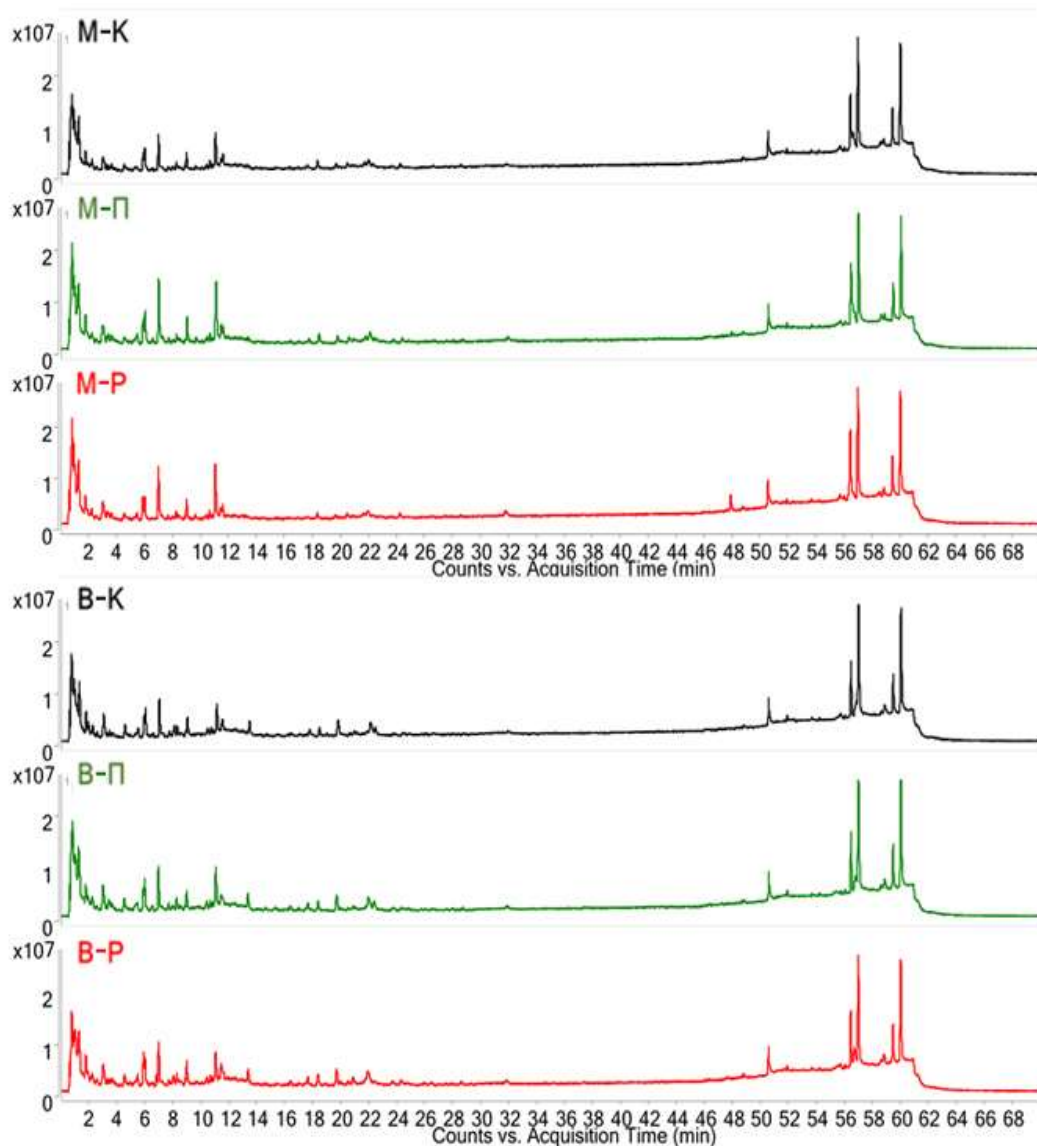
За идентификација и структурна карактеризација, примероците беа анализирани со QTOF-MS. Масената спектрометрија која се изведува со комбинација на квадрупол поврзан со масен анализатор со време на прелетување е многу ефикасна техника за карактеризација на полифеноли во вина, вклучувајќи флаван-3-оли, фенолни киселини, антоцијани, процијанидини. Оваа техника овозможува проучување на глукозидните компоненти, при тоа овозможувајќи карактеризација на агликоните и шеќерните групи. Идентификацијата на пиковите беше извршена со споредба на MS и MS-MS спектрите и ретенционите времиња на стандардите кои беа достапни. Но, бидејќи располагаваме со мал број на стандарди, поголем број од пиковите беа идентификувани со споредба на добиените MS-MS спектри со спектри и фрагментации на соодветните јони од литература: (Wulf & Nagel, 1978; da Silva et al., 1991; Bakker & Timberlake, 1997; Perez-Magarino et al., 1999; Vitrac et al., 2001; Ivanova et al., 2009; Ivanova et al., 2010; Ivanova et al., 2011; Pati et al., 2014; Casassa & Herbertson, 2014; Muñoz-Bernal et al., 2023). На слика 24 и 25 се прикажани вкупни јонски хроматограми снимени во негативен и позитивен јонски мод, соодветно, на сите анализирани примероци вино. На слика 26 се прикажани масените спектри на некои фенолни компоненти.



Слика 24. Вкупни јонски хроматограми на винота Мерло и винота Вранец снимени во негативен јонски мод

Figure 24. Total ion chromatograms of Merlot and Vranec wines recorded in negative ion mode

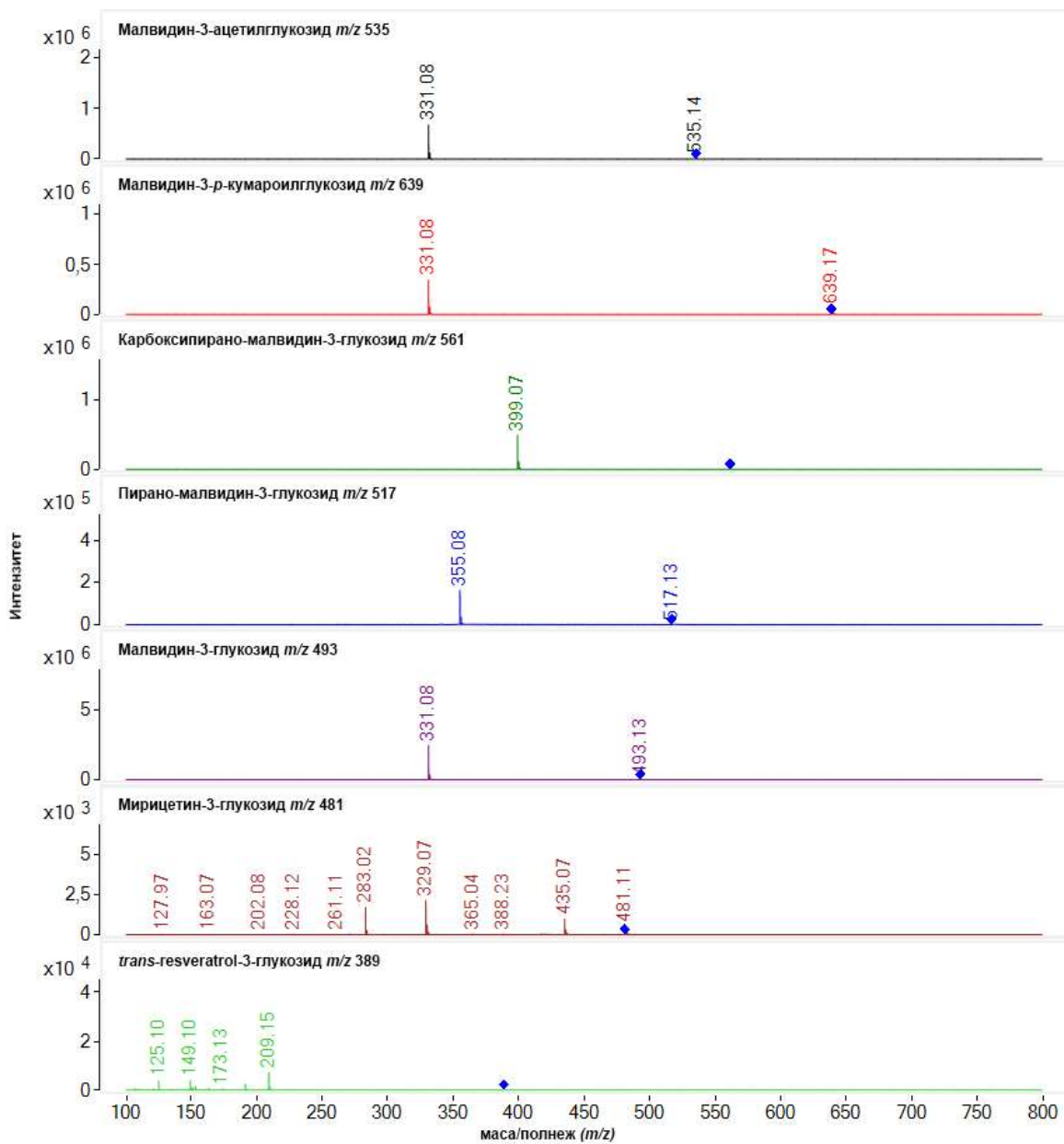
Ознаки: В-К: вино Вранец добиено со класична ферментација, В-Р: вино Вранец добиено со рото метода, В-П: вино Вранец добиено со punchdown метода, М-К: вино Мерло добиено со класична метода, М-Р: вино Мерло добиено со рото метода, М-П: вино Мерло добиено со punchdown метод.



Слика 25. Вкупни јонски хроматограми на винота Мерло и вината Вранец снимени во позитивен јонски мод

Figure 25. Total ion chromatograms of Merlot and Vranec wines recorded in positive ion mode

Ознаки: В-К: вино Вранец добиено со класична ферментација, В-Р: вино Вранец добиено со рото метода, В-П: вино Вранец добиено со punchdown метода, М-К: вино Мерло добиено со класична метода, М-Р: вино Мерло добиено со рото метода, М-П: вино Мерло добиено со punchdown метод.



Слика 26. Масени спектри на некои карактеристични фенолни компоненти во примероците вино

Figure 26. Mass spectra of some characteristic phenolic components in wine samples

Беа идентификувани вкупно 54 полифенолни компоненти во вината. Во Табела 8 се прикажани сите идентификувани фенолни компоненти, даден е односот маса/полнеж ( $m/z$ ), ретенционото време и нивните фрагментни јони. Обработката на податоците беше извршена со софтвер Agilent MassHunter Qualitative Analysis Navigator B.08.00–QualDAM.

➤ **Фенолни киселини и нивни деривати**

Од групата на фенолни киселини беа идентификувани вкупно 9 фенолни киселини. Од групата на хидроксибензоеви киселини беа детектирани гална киселина, 3,4-дихидроксибензоева киселина и сирингинска киселина. Од групата на хидроксициметни киселини, детектирани беа кафтарна киселина, ферулна киселина, кафена киселина, *p*-кумарна киселина, *p*-кутарна киселина и синапинска киселина. Сите беа идентификувани како депротонирани  $[M-H]^-$  јони во негативен јон мод. Од хидроксибензоевите киселини, галната киселина беше детектирана на ретенционо време од 1,8 min во негативен јонски мод со  $m/z$  169 и формиран фрагмент со  $m/z$  125, како резултат на губење на молекула  $CO_2$  од карбоксилната група (Monogas et al., 2005). Останатите хидроксибензоеви киселини, 3,4-дихидроксибензоева киселина и сирингинска киселина беа идентификувани на ретенционо време 3,1 min и 9,5 min соодветно и добиени сигнали на  $m/z$  153 и 197, соодветно како резултат на губење на молекула  $CO_2$  од карбоксилната група (табела 8).

Од дериватите на хидроксициметните киселини, беа идентификувани следните соединенија: кафеоилтартарната киселина (кафтарна киселина) со молекулска маса  $m/z$  311 (фрагментни јони:  $m/z$  179, 149), *p*-кумароилтартаратна киселина (кутарна киселина) со молекулска маса  $m/z$  295 (фрагментен јон:  $m/z$  163), и ферулна киселина, со молекулска маса  $m/z$  193 (фрагментен јон:  $m/z$  193) и ретенциони времиња од 22,1 min; 28,4 min; 13,8 min соодветно. Овие киселини даваат фрагменти како резултат на губење на остатоци од винска (тартаратна киселина) и произведуваат карактеристични фрагментирани јони  $[M-H-132]^-$ . Кафената киселина беше детектирана на ретенционо време од 8,1 min и сигнал на  $m/z$  179 во негативен јонски мод и фрагмент со  $m/z$  135 како резултат на губење на

карбоксилна група (табела 8). Кутарната и синапинската киселина се детектирани на ретенциони времиња од 3,2 min и 28,4 min соодветно. Добиените резултати се во согласност со резултати објавени во литература (Baranowski & Nagel, 1981).

Табела 8. Идентификувани полифенолни компоненти во вината Вранец и Мерло  
Table 8. Identified polyphenolic components in Vranec and Merlot wines

Фенолна компонента	t <sub>R</sub> (min)	Δ t <sub>R</sub> (±)	MS (m/z)	MS-MS (m/z) фрагменти
<b>Фенолни киселини</b>				
<b>Хидроксибензоєви киселини</b>			<b>[M-H]<sup>-</sup></b>	
Гална киселина	1,8	0,02	169	125
3,4-Дихидоксибензоєва киселина	3,1	0,01	153	315, 285
Сирингинска киселина	9,5	0,01	197	183, 153, 138
<b>Хидроксициметни киселини</b>			<b>[M-H]<sup>-</sup></b>	
Синапинска киселина	3,2	0,04	223	208, 179, 164
Кафена киселина	8,1	0,05	179	135
p-Кумарна киселина	11,4	0,01	163	179, 149, 134
Ферулна киселина	13,8	0,04	193	193
Кафтарна киселина	22,1	0,01	311	179, 149
p-Кутарна киселина	28,4	0,02	295	163
<b>Флавоноли</b>			<b>[M+H]<sup>+</sup></b>	
Кверцетин-3-глур	21,6	0,01	479	303
Кверцетин-3-глу	21,9	0,04	465	303
Мирицетин-3-глур	22,1	0,02	495	319
Кверцетин	31,2	0,01	303	/
Мирицетин-3-глу	41,4	0,02	481	319
Ларицитрин-3-глу	47,1	0,01	495	333
<b>Дихидрофлавоноли</b>			<b>[M-H]<sup>-</sup></b>	
Астилбин	1,7	0,08	449	303, 285
Дихидромирицетин-3-О-рам	13,4	0,05	465	319, 301
<b>Флаван-3-оли</b>			<b>[M-H]<sup>-</sup></b>	
Епикатехин-3-О-глу	0,6	0,01	435	331, 271, 227
Катехин-3-О-гал	1,4	0,02	441	341, 289, 269, 165
Галокатехин	2,4	0,02	305	261, 221, 219, 165
Процијанидин В2	5,4	0,02	577	559, 451 425, 289
Процијанидин В3	6,1	0,02	577	559, 451 425, 289
(+)-Катехин	7,1	0,01	289	245, 205, 179
Процијанидин В4	7,2	0,03	577	559, 451 425, 289
Процијанидин В1	9,1	0,02	577	559, 451 425, 289
(-)-Епикатехин	11,0	0,03	289	245, 205, 179
(-)-Епикатехин-3-О-гал	15,1	0,01	441	289, 169

<b>Стилбени</b>			<b>[M-H]<sup>-</sup></b>	
<i>cis</i> -ресвератрол-3-О-глу	4,2	0,01	389	227
<i>trans</i> -ресвератрол-3-О-глу	22,3	0,01	389	227
<b>Антоцијани</b>			<b>M+</b>	
<b>Моноглукозиди</b>				
Делф-3-глу	14,5	0,01	465	303
Ција-3-глу	17,0	0,02	449	287
Мал-3-глу	21,1	0,01	493	331
Пету-3-глу	32,4	0,05	479	317
Пејо-3-глу	37,8	0,02	463	301
<b>Ацетилглукозиди</b>			<b>M+</b>	
Пету-3-ацетилглу	18,4	0,01	521	317
Делф-3-ацетилглу	20,1	0,02	507	303
Ција-3-ацетилглу	20,2	0,02	491	287
Пејо-3-ацетилглу	20,9	0,02	505	301
Малв-3-ацетилглу	31,7	0,08	535	331
<b><i>p</i>-Кумароилглукозиди</b>			<b>M+</b>	
Пету-3- <i>p</i> -кумароилглу	19,2	0,04	625	317
Ција-3- <i>p</i> -кумароилглу	22,0	0,05	595	287
Делф-3- <i>p</i> -кумароилглу	22,1	0,01	611	303
Пејо-3- <i>p</i> -кумароилглу	24,1	0,03	625	301
Малв-3- <i>p</i> -кумароилглу	39,8	0,02	639	331
<b>Кафеоилглукозиди</b>			<b>M+</b>	
Мал-3-кафеоилглу	29,0	0,01	655	331
Пејо-3-кафеоилглу	29,2	0,02	625	301
Пету-3-кафеоилглу	29,7	0,01	641	317
<b>Карбоксипирано антоцијани</b>			<b>M+</b>	
Карбокси-пирано-малв-3-глу	30,6	0,01	561	399
Карбокси-пирано-малв-3- <i>p</i> -кумароилглу	42,0	0,01	707	399
Карбоксип-пирано-3-ацетилглу	44,2	0,02	603	399
Карбокси-пирано-пеј-3-глу	45,2	0,04	531	369
<b>Пираноантоцијани</b>			<b>M+</b>	
Пирано-малв-3-глу	27,3	0,02	517	355
Пирано-малв-3-ацетилглу	36,2	0,01	559	355
Пирано-малв-3- <i>p</i> -кумароилглу	41,1	0,05	663	355

$t_R$ : ретенционо време во min,  $\Delta$ : отстапување од ретенционото време  $\pm$  min

Кратенки: глу-глукозид, глур-глукуронид, гал-галат, рам-рамнозид

, ацетилглу-ацетилглукозид, кумароилглу-кумароилглукозид, мал-малвидин, пејо-пејонидин, пету-петунидин, делф-делфинидин, ција-цијанидин.

➤ **Флавоноли**

Во сите примероци од вино беа детектирани 6 флавоноли. Агликонот кверцетин е детектиран како  $[M+H]^+$  јон со молекулска маса  $m/z$  303. Глукозидните деривати на мирицетин, кверцетин и ларицитрин беа детектирани на ретенциони времиња од 41,4 min; 21,9 min и 47,1 min соодветно. Сите даваат карактеристичен сигнал  $[M+H]^+$  и фрагментни јони  $[M+H-162]^+$  како резултат на губење на молекула глюкоза (162 Da) (Castillo-Munoz et al., 2007). Глукуронидните деривати на мирицетин и кверцетин (мирицетин-3-глукуронид и кверцетин-3-глукуронид) исто така се детектирани во примероците на вино со молекулски јон  $[M+H]^+$  со  $m/z$  495 и 479, соодветно. При фрагментација на јоните се добиваат фрагменти како резултат на елиминација на маса од 176 Da која соодветствува на глукуронидната група (Cheynier & Rigaud, 1986). Ретенционите времиња на кои се детектирани глукуронидните деривати на кверцетин и мирицетин се 21,6 min и 22,1 min, соодветно.

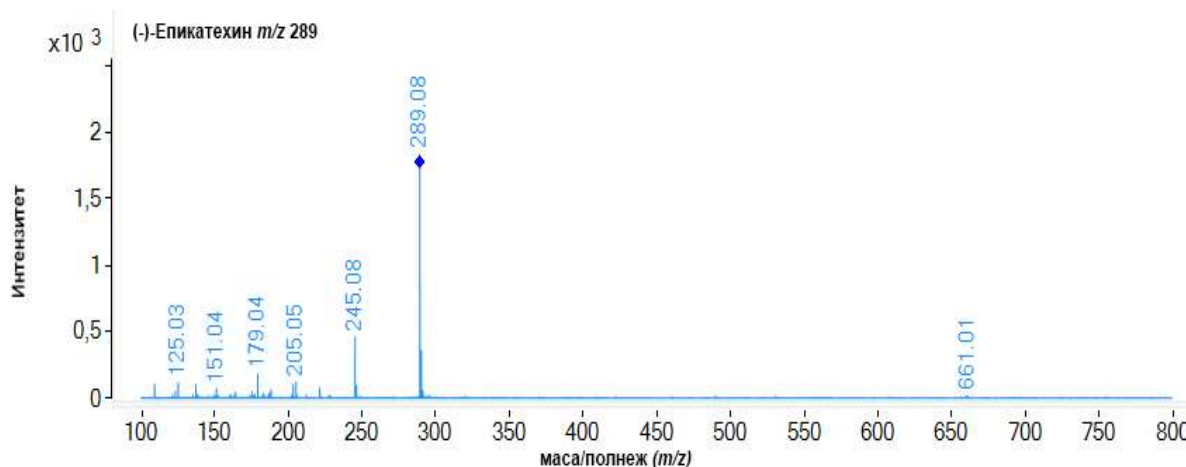
➤ **Дихидрофлавоноли**

Од групата на дихидрофлавоноли беа детектирани дихидрокверцетин-3-О-рамнозид (астилбин) и дихидромирицетин-3-О-рамнозид со  $[M-H]^-$  молекулски јони на  $m/z$  449 и 465, соодветно (Vitrac et al., 2001). Астилбин формира фрагменти на  $m/z$  303 и 285 и дихидромирицетин-3-О-рамнозид формира фрагменти на  $m/z$  319 и 301, за како резултат на елиминација на рамнозидна група (-164 Da) (табела 8).

➤ **Флаван-3-оли**

Беа детектирани вкупно 10 флаван-3-оли. Мономерните флаван-3-оли (+)катехин и (-)епикатехин беа идентификувани во негативен јонски мод  $[M-H]^-$  на ретенциони времиња од 7,1 min и 11,0 min, соодветно, со формирање на молекулски јон на  $m/z$  289 и фрагментни јони на  $m/z$  245, 205 и 179 (Табела 8) (Ivanova et al., 2011). На слика 27 прикажан е масениот спектар на (-)епикатехин идентификуван во негативен јонски мод и ретенционо време 11,0 min.





Слика 27. Масен спектар на (-)епикатехин  
 Figure 27. Mass spectrum of (-)epicatechin

(-)-Епикатехин-3-О-галат има молекулски јон на  $m/z$  441 и создава два фрагментни јони:  $m/z$  289 како резултат на губење на 152 Da како резултат на фузија на В прстенот и фрагментен јон на  $m/z$  169 кои одговара на остатоци од галат. Компонентите со ретенциони времиња 5,4; 6,1; 7,2 и 9,1 min и формираат молекулски јон на  $m/z$  577 и се идентификувани како процијанидини В3, В1, В4 и В2 (Ivanova et al., 2011). Овие компоненти образуваат четири фрагментни јони на  $m/z$  559, 451, 425, 289 (Baldi et al., 1995; da Silva et al., 1991). Првиот фрагментен јон ( $m/z$  559) се формира како резултат на елиминиција на молекула вода, додека вториот фрагментен јон ( $m/z$  451) се формира како резултат на губење на флороглуцинол (-126 Da). Фрагментниот јон на  $m/z$  425 настанува како резултат на *Retro-Diels-Alder* реакција на С прстенот, додека фрагментниот јон на  $m/z$  289 одговара на молекула флавонол со пониска единица од димер молекула.

### ➤ **Стилбени**

Од групата на стилбени беа детектирани *cis* и *trans*-ресвератрол-3-О-глукозид на ретенциони времиња 4,7 min и 22,3 min, соодветно. Тие даваат псевдо-молекуларен јон  $[M-H]^-$  на  $m/z$  389 и формираат фрагменти на  $m/z$  227 што одговара на делови ресвератрол со губење на молекула глукоза (табела 8).

### ➤ Антоцијани и други пигменти

Од групата на антоцијаните беше потврдено присуството на 3-моноглукозиди, 3-ацетилглукозиди и 3-*p*-кумароилглукозидни деривати на петте основни антоцијанидини: делфинидин, цијанидин, пејонидин, петунидин и малвидин. Сите антоцијани имаат сличен масен спектар кој содржи два сигнали, оригиналниот  $M^+$  молекуларен јон и агликонски фрагменти  $[M-162]^+$ ,  $[M-204]^+$  и  $[M-308]^+$  кои се јавуваат како резултат на елиминација на глукозидна, ацетилглукозидна и *p*-кумароилглукозидна група, соодветно (Baldi et al., 1995; Vergara et al., 2010) (табела 8). Од групата на моноглукозиди детектиран е малвидин-3-глукозид на ретенционо време 21,1 min. Малвидин-3-глукозидот дава сигнал на  $m/z$  493 и фрагмент на  $m/z$  331 како резултат на елиминација на глукозидна група. Останатите моноглукозиди пејонидин-3-глукозид, делфинидин-3-глукозид, петунидин-3-глукозид и цијанидин-3-глукозид беа детектирани на ретенциони времиња 37,8 min, 14,5 min, 32,4 min и 17,0 min соодветно, и даваат карактеристични фрагменти како резултат на елиминација на глукозидна група. На слика 28 се прикажани масените спектри на моноглукозидите (малвидин-3-глукозид, пејонидин-3-глукозид, петунидин-3-глукозид, цијанидин-3-глукозид и делфинидин-3-глукозид).

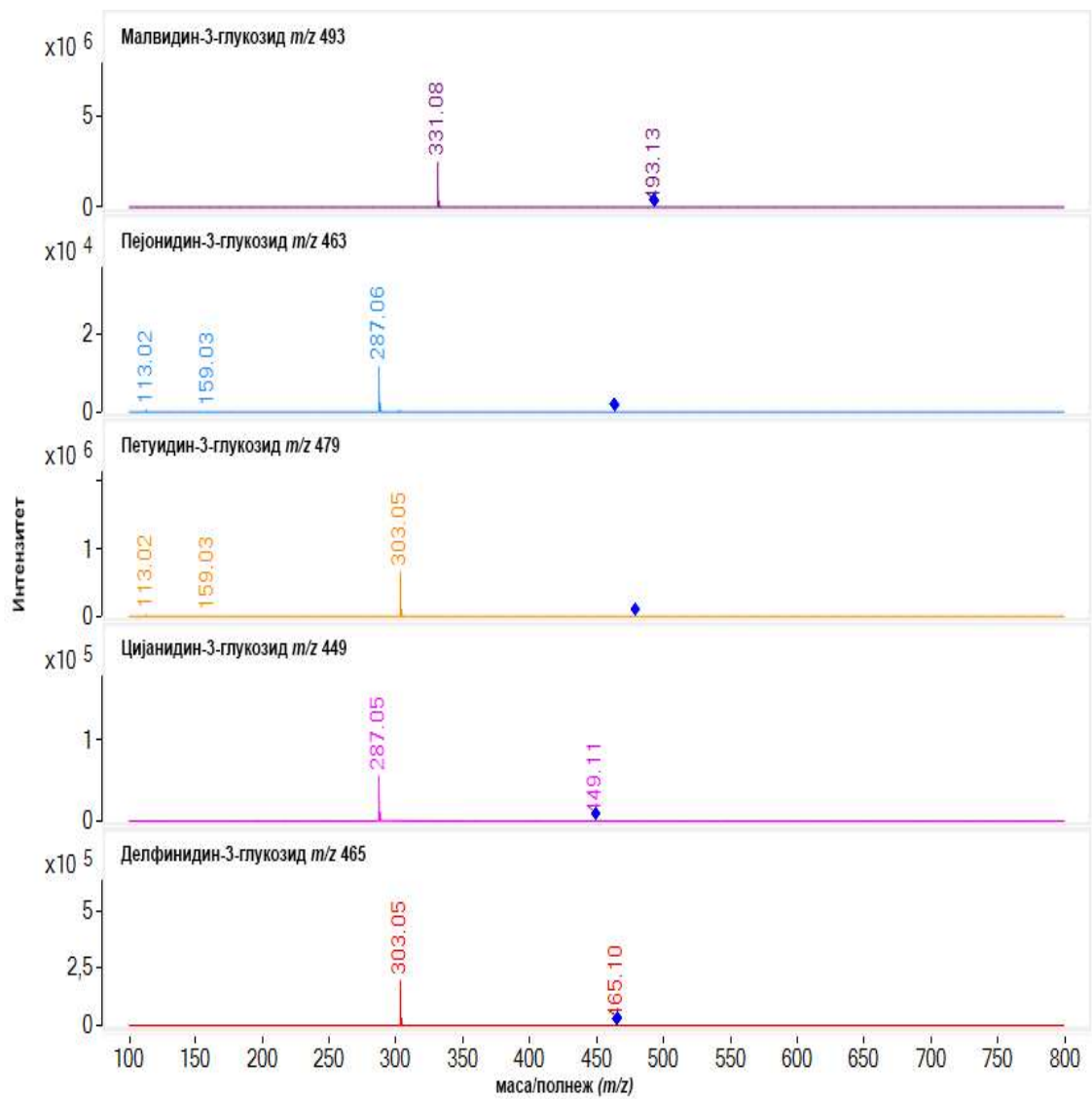
Беа детектирани пет ацетилглукозиди и тоа: петунидин-3-ацетилглукозид, делфинидин-3-ацетилглукозид, цијанидин-3-ацетилглукозид, пејонидин-3-ацетилглукозид и малвидин-3-ацетилглукозид со ретенциони времиња 18,4 min, 20,1 min, 20,2 min, 20,9 min и 31,7 min, соодветно. Сите ацетилглукозиди даваат сигнал на  $m/z$  521, 507, 491, 505 и 535 како резултат на елиминација на ацетилглукозидна група. Идентификувани беа пет кумароилглукозиди: петунидин-3-*p*-кумароилглукозид, цијанидин-3-*p*-кумароилглукозид, делфинидин-3-*p*-кумароилглукозид, пејонидин-3-*p*-кумароилглукозид и малвидин-*p*-кумароилглукозид со ретенциони времиња 19,2 min, 22,0 min, 22,1 min, 24,1 min и 39,8 min соодветно. Сите детектирани кумароилглукозиди даваат фрагменти на  $m/z$  317, 287, 303, 301 и 331, како резултат на елиминација на кумароилглукозидна група.

Компонентата со  $M^+$  молекуларен јон детектиран на  $m/z$  655 и агликонски фрагмент на  $m/z$  331 кој одговара на губење на кафеоилглукозидна молекула со  $m/z$  324 е идентификуван како малвидин-3-кафеоилглукозид. Кафеоилглукозидните

деривати на петуидин и пејонидин исто така се детектирани во примероците вино и даваат сигнал на  $m/z$  641 и 625, соодветно.

Пироантоцијаните кои се формираат со реакција на циклична адиција на антоцијаните со пирогроздова киселина (Cheynier et al., 1997; Fulcrand et al., 1998) се нарекуваат карбокси-пирано антоцијани и беа детектирани во примероците вино. Така, соединенијата со  $M^+$  молекулски јон на  $m/z$  561, 603 и 707 се идентификувани како карбокси-пирано-малвидин-3-глукозиди (витисин А), карбокси-малвидин-3-ацетилглукозид (ацетилвитисин А) и карбокси-пирано-малвидин-3-*p*-кумароил глукозид (*p*-кумароилвитисин А), соодветно, сите давајќи ист фрагментен јон на  $m/z$  399 кој одговара на карбокси-пирано-малвидин агликон, односно на елиминирање на глукозидна, ацетилглукозидна и *p*-кумароилглукозидна група, соодветно. Друг пираноантоцијан кој дава сигнал на  $m/z$  531 и фрагментен јон на  $m/z$  369 како резултат на елиминација на глукозидна група (162 Da) е идентификуван како карбокси-пирано-пејонидин-3-глукозид.

Продуктите кои се добиваат со реакција помеѓу антоцијаните и ацеталдехид (пираноантоцијани) се детектирани во анализираниите примероци вино. Овие компоненти имаат масен спектар составен од  $M^+$  молекулски јон на  $m/z$  517, 559, и 663 и се идентификувани како пирано-малвидин-3-глукозид (витисин В), пирано-малвидин-3-ацетилглукозид (ацетилвитисин В) и пирано-малвидин-3-кумароилглукозид (кумароилвитисин В), соодветно, формирајќи фрагментни јони на  $m/z$  355 како резултат на елиминација на молекула глюкоза (-162 Da), ацетилглюкоза (-204 Da) и *p*-кумароилглюкоза (-308 Da), соодветно.



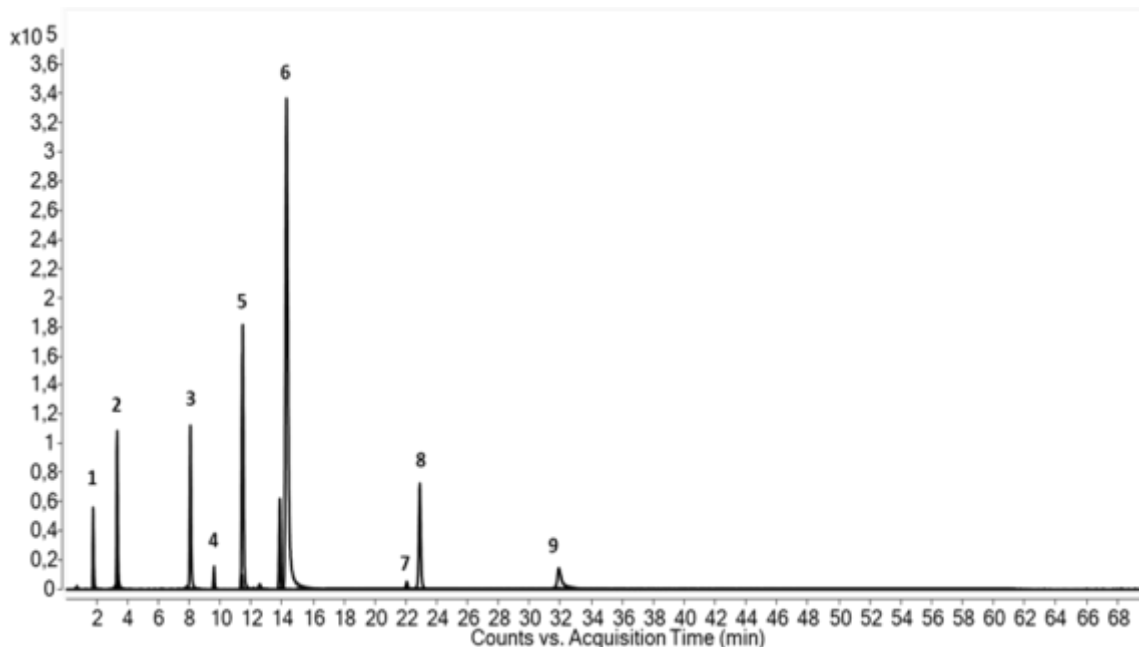
Слика 28. Масени спектри на детектираните моноглукозиди во примероците вино

Figure 28. Mass spectra of the detected monoglucosides in the wine samples

#### **4.3.2. Квантификација на полифеноли во вината Вранец и Мерло**

По извршената детекција на поединечните полифеноли со примена на масен детектор Agilent 6530 QTOF/MS (Agilent Technologies), во вината Вранец и Мерло произведени со три различни ферментатори (класичен ферментатор, рото ферментатор и ферментатор со потиснување) беше извршена квантификација и семиквантификација на полифенолите во примероците вино. При тоа, беше применето повеќестепено градиентно елуирање со мобилна фаза составена од раствор А: 1 % (v/v) оцетна киселина во вода, и раствор Б: 1% (v/v) оцетна киселина во метанол. Со оваа мобилна фаза беше постигнато сепарирање на поединечни нефлавоноиди, но сепарирање на антоцијани и флаван-3-оли не беше постигнато бидејќи овие соединенија со применетата мобилна фаза коелуираат заедно. Но, бидејќи користевме масен спектрометар Agilent 6530 QTOF-MS (Agilent Technologies), кој овозможува висока точност во определување на маси на соединенија со точност од четврта децимала, поединечно раздвојување и не беше потребно. Со издвојување на екстрахирани јонски хроматограми на соодветните  $m/z$  вредности, беа пресметани површините на соодветните пикови и тие беа користени за семиквантификациони цели.

Во моментот на разработка на методата и анализа на вината во лабораториите на Универзитетот во Печ-Унгарија (Институт за биоанализи), главно нефлавоноиди беа достапни и искористени за оптимизација и валидација на методата. На слика 29 е прикажан хроматограм од стандардни раствори користени за валидација на методата снимен во негативен јонски мод.



Слика 29. Вкупен UPLC хроматограм на смеса од стандардните раствори :  
 1- гална киселина, 2- 3,4-дихидроксибензоева киселина, 3-кафена киселина, 4-  
 синрингинска киселина, 5-*p*-кумарна киселина, 6-ферулна киселина, 7- *trans*-  
 ресвератрол, 8-рутин, 9- кверцетин

Figure 29. Total UPLC chromatogram of a mixture of standard solutions:  
 1- gallic acid, 2- *p*-dihydroxybenzoic acid, 3-caffeic acid, 4-syringic acid, 5-*p*-coumaric  
 acid, 6- ferulic acid, , 7- *trans*-resveratrol, 8- rutin, 9- quercetin

➤ **Валидација на UPLC-MS-QTOF метод за квантификација на нефлавоноиди и семиквантификација на флавоноиди во вината Вранец и Мерло**

По претходна оптимизација на соодветните параметри за анализа на компонентите од интерес, со цел да се потврди соодветноста на дадената метода, потребно е да се изврши валидација. Валидацијата на методата се врши преку определување на следните параметри:

- **Прецизност** – степен на повторливост во случаи кога методата се користи за анализи на исти примероци.

- **Точност** – приближување на измерените вредности до вистинските номинални вредности. Проценката на резултатите се врши преку анализа на стандарди за определување на нивниот аналитички принос (recovery).
- **Линеарност** – можноста за добивање резултати кои директно или со математички пресметки се пропорционални на концентрацијата во даденото линеарно подрачје на работа.
- **Репродуцибилност** – степен на повторливост на резултатите добиени со анализа на истата компонента, со мали варијации на испитуваните услови.
- **Граница на детекција** – определување на минимално количество на детектирана компонента, без неопходна квантификација.
- **Граница на квантификација** – определување на минимално количество детектирана компонента со неопходно прифатлива точност и прецизност

Сите овие параметри беа определени во овој магистерски труд на следниот начин:

#### **Линеарност:**

Линеарноста беше тестирана три дена во шест концентрациски точки со примена на девет стандардни раствори (гална киселина, ферулна киселина, кафена киселина, *p*-кумарна киселина, 3,4-дихидроксибензоева киселина, рутин, кверцетин и ресвератрол). Стандардните раствори беа подготвени во опсег на концентрации од 0,62 до 20 mg/L. Податоците за линеарноста како што се наклонот, отсечокот, регресионата права и коефициентот на детерминација ( $R^2$ ) се прикажани во Табела 9. Линеарноста е задоволителна за сите стандарди, а коефициентот на детерминација е поголем од 0,99 ( $R^2 > 0,99$ ) и се движи од 0,9976 за кумарна киселина до 0,9997 за 3,4-дихидроксибензоевата киселина (табела 9).

#### **Граница на детекција и граница на квантификација:**

Границата на детекција (Limit of detection (LOD)) беше определена со равенката  $LOD = 3 \times SD / \text{наклонот}$ , а границата на квантификација (Limit of quantification (LOQ)) е определена со равенката  $LOQ = 10 \times SD$  (стандардна девијација). Стандардната девијација (SD) се добива со собирање на површините на пиковите од три мерења. Вредностите на LOD и LOQ се движат од 1,25 (кафена

киселина) до 0,45 mg/L (ферулна киселина) и од 3,84 (ресвератрол) до 0,34 mg/L (сирингинска киселина), соодветно.

Табела 9. Податоци за линеарна регресија: опсег на определување, коефициент на кривата на регресија (нак,олон и отсечок), коефициент на корелација  $R^2$ , граница на детекција (LOD) и граница на квантификација (LOQ)

Table 9. Linear regression data: range of determination, coefficients of the regression curves (slope and intercept), coefficient of determination  $R^2$ , LOD and LOQ

Стандард	Опсег (mg/L)	Наклон (mg/L)	Отсечок	$R^2$	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Гална киселина	0,62-20	22250	18157	0,9997	1,00	3,03
3,4-ДХБК	0,62-20	45991	18157	0,9996	0,65	1,96
Сирингинска киселина	0,62-20	66531	10260	0,9997	0,11	0,34
Ферулна киселина	0,62-20	63032	10260	0,9992	0,45	1,37
Кафена киселина	0,62-20	63032	17661	0,9989	1,25	3,78
<i>p</i> -Кумарна киселина	0,62-20	47385	18157	0,9976	0,65	2,02
<i>trans</i> -Ресвератрол	0,62-20	71031	-32210	0,9998	1,27	3,84
Рутин	0,62-20	53342	-24695	0,9987	0,89	2,69
Кверцетин	0,62-20	74971	-15859	0,9997	1,12	3,32

ДХБК = Дихидроксибензоева киселина

### **Прецизност:**

Прецизноста е изразена како релативна стандардна девијација (RSD) од повторени мерења на иста концентрација во текот на еден ден и во текот на неколку последователни дена. Задоволителни резултати за RSD се сметаат оние кои се помали од 20% за најниската концентрација на стандардниот раствор и помали од 10% на стандардот со највисока концентрација. Во оваа магистерска работа прецизноста беше определена преку интер и интра-дневната прецизност со инјектирање на смеса од стандардни раствори со најниска концентрација (0,62 mg/L) и највисока концентрација (20 mg/L). Интрадневната прецизност беше изведена со три повторувања во тек на еден ден, додека пак интердневната прецизност беше определена во текот на 3 последователни денови со три повторувања на растворите. Вредностите за релативната стандардна девијација



(RSD) за секој аналит беа пониски од 5% со што се потврдува дека предложениот метод е прецизен (табела 10).

Табела 10. Инердневна и интрадневна прецизност

Table 10. Inter-day and intra-day accuracy

Стандард	Интрадневна прецизност (RSD на површина на пик %)		Интердневна прецизност (RSD на површина на пик %)	
	n=3		n=9	
	0,62 mg/L*	20 mg/L**	0,62 mg/L*	20 mg/L**
Гална киселина	6,6	2,6	6,4	2,2
3,4-ДХБК	4,1	2,8	2,1	5,5
Сирингинска киселина	6,4	5,7	5,1	8,7
Ферулна киселина	5,7	0,7	2,2	1,1
Кафена киселина	9,1	1,8	6,4	3,5
p-Кумарна киселина	1,9	5,1	2,1	5,5
trans-Ресвератрол	3,6	3,6	5,8	2,4
Рутин	4,6	7,4	4,3	6,6
Кверцетин	3,2	5,5	4,6	7,6

ДХБК = Дихидроксисбензоева киселина

\*Стандарден раствор со најниска концентрација на фенолни компоненти

\*\*Стандарден раствор со највисока концентрација на фенолни компоненти

### Точност:

Во овој труд, точноста беше потврдена со метод на стандарден додаток на реален примерок од вино. За таа цел беше избран еден примерок на вино, Вранец добиен со рото метода (B-P) и кон примерокот е додаден стандарден раствор во две концентрации: најниска (0,62 mg/L) и највисока концентрација (20 mg/L). Резултатите се задоволителни доколку вредноста на релативната грешка е помала од 20 % за ниски концентрации и помала од 10 % за високи концентрации. Притоа, приносите се пресметани според следната равенка:

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

Резултатите добиени од методата на стандарден додаток се дадени во табела 11. Добиените вредности за приносот се во граници од 91,9% до 109%, со што се потврдува точноста на методот и неговата соодветност за определување на полифенолниот состав кај виното.

Табела 11. Резултати од метода на стандарден додаток за проверување на точноста на UPLC-QTOF-MS методата за определување на полифеноли во вино

(n = 3)

Table 11. Results of the standard addition method for checking the accuracy of the UPLC-MS-QTOF method for the determination of polyphenols in wine (n = 3)

Компонента	I Концентрација				II Концентрација		
	Реална кон. (mg/L)	Додадена кон. (mg/L)	Најдена кон. (mg/L)	Принос %	Додадена кон. (mg/L)	Најдена кон. (mg/L)	Принос %
Гална киселина	278	0,62	279	102	20	297	99,7
3,4-ДХБК	9,34	0,62	9,19	91,9	20	20,4	99,8
Сирингинска киселина	100	0,62	101	109	20	121	100
Ферулна киселина	6.75	0,62	7,31	90,3	20	26,7	99,8
Кафена киселина	13.8	0.,62	14,5	108	20	33,8	99,9
p-Кумарна киселина	0,51	0,62	1,11	96,7	20	20,4	99,4
trans-Ресвератрол	5.17	0,62	5,77	96,7	20	24,9	98,6
Рутин	7.17	0,62	7,74	91,9	20	27,2	100
Кверцетин	9.14	0,62	9,81	110	20	29,1	99,6

ДХБК = Дихидроксибензоева киселина  
кон.: концентрација

### **Повторливост и репродукцибилност:**

Овие параметри се определени со анализа на еден реален примерок вино, Вранец добиен со рото метода (B-P). При тоа, беа направени 3 повторувања во еден ден за определување на повторливоста и по три мерења во тек на 3 последователни дена за определување на репродукцибилноста. Концентрациите на аналитите беа пресметани од нивните соодветни калибрациони криви При тоа, беа пресметани вредностите на релативната стандардна девијација (RSD) и тие се движат во граници од 1,1 % до 6,0 % за повторливоста и од опсег од 1,7 % до 5,4 %

за репродуцибилноста. Со ова беше утврдено дека применетата метода е повторлива и репродуцибилна и може да се примени за анализа на реални примероци вино. Резултатите се дадени во табела 12.

Табела 12. Повторливост и репродуцибилност на метода  
Table 12. Reproducibility and reproducibility of the method

Компонента	Повторливост (3 повторувања) Средна концентрација (mg/L)		Репродуцибилност (3 повторувања x 3 дена) Средна концентрација (mg/L)	
		RSD %		RSD %
Гална киселина	278	2,2	178	2,8
3,4-ДХБК	98,5	1,8	9,91	2,3
Сирингинска киселина	101	2,1	101	2,2
Ферулна киселина	6,47	2,6	6,44	2,8
Кафена киселина	14,2	1,1	13,9	2,1
<i>p</i> -Кумарна киселина	0,59	1,8	0,54	1,7
<i>trans</i> -Ресвератрол	5,16	1,3	5,14	1,8
Рутин	7,19	6,0	7,16	5,4
Кверцетин	9,18	3,4	9,14	3,6

ДХБК = Дихидроксibenзоева киселина

➤ **Квантификација на нефлавоноиди и семиквантификација на флавоноиди во вината Вранец и Мерло**

Со примена на валидираната метода за определување на нефлавоноиди во виното, беше извршена *квантификација* на следните компоненти: гална киселина, 3,4-дихидроксibenзоева киселина, сирингинска киселина, ферулна киселина, кафена киселина, *p*-кумарна киселина, *trans*-ресвератрол, рутин и кверцетин. Резултатите се прикажани во табела 13. Доминантна киселина во сите вина е галната киселина (средна вредност: 219 mg/L за Вранец и 189 mg/L за Мерло), проследена со сирингинската киселина (средна вредност: 80,9 mg/L за Вранец и 79,8 mg/L за Мерло). Во однос на хидроксициметните киселини, доминантна е кафената киселина (средна вредност: 5,78 mg/L за Вранец и 6,73 mg/L за Мерло),

проследена со ферулната киелина (средна вредност: 4,47 mg/L за Вранец и 2,09 mg/L за Мерло).

Од групата на стилбени беше квантифициран *trans*-ресвератрол и неговата концентрација се движи во граници од 0,11 до 5,17 mg/L за сортата Вранец и од 2,36 до 5,89 mg/L за сортата Мерло. Највисока содржина на *trans*-ресвератрол беше измерена во виното Вранец добиено со рото метода на ферментација (5,17 mg/L B-P), проследено со виното Мерло добиено со рото метода на ферментација (5,89 mg/L M-P). Во однос на литературните податоци (Raičević et al., 2020), добиените вредности во ова истражување за *trans*-ресвератрол во анализираниите вина Вранец и Мерло се повисоки.

Од групата на флавоноли беа квантифицирани рутин и кверцетин. Концентрацијата на рутин се движи во граници од 0,92 до 7,17 mg/L за вината Вранец, додека пак во вината Мерло измерена е концентрација на рутин од 0,46 до 7,15 mg/L. Концентрацијата на кверцетин се движи во граници од 0,98 до 9,14 mg/L, при што највисока содржина на кверцетин е измерена во виното Вранец добиено со рото метода на ферментација (9,14 mg/L B-P) и виното Мерло добиено со рото метода на ферментација (7,85 mg/L M-P).

Во однос на влијанието на типот на ферментација, може да се заклучи дека вината од двете сорти, и Вранец и Мерло, добиени со рото ферментација имаат највисока содржина од сите 9 квантифицирани полифеноли. Всушност, со рото ферментација се постигнува највисока екстракција на овие компоненти од лушпите од грозјето каде што тие се лоцирани, бидејќи се овозможува најефикасен контакт меѓу тврдите делови од грозјето со течноста.

Табела 13. Содржина на нефлавоноиди и флавоноиди во вина од сортите Вранец и Мерло произведени со класична, рото и метода на потиснување (punch-down) изразени во mg/L.

Table 13. Content of non-flavonoids and flavonoids in Vranec and Merlot wines produced by classical, roto and punchdown methods expressed in mg/L.

Вино	Гална киселина (mg/L)	3,4- ДХБК (mg/L)	Сирингинска Киселина (mg/L)	Ферулна киселина (mg/L)	Кафена киселина (mg/L)	<i>p</i> - Кумарна киселина (mg/L)	<i>trans</i> - Ресвератрол (mg/L)	Рурин (mg/L)	Кверцетин (mg/L)
<b>В-К</b>	118	1,52	48,1	2,45	1,32	0,11	0,11	0,92	2,58
<b>В-Р</b>	278	9,34	100	6,75	13,8	0,51	5,17	7,17	9,14
<b>В-П</b>	261	2,62	94,6	4,22	2,22	0,41	2,96	4,21	6,63
<b>С.В</b>	<b>219</b>	<b>4,49</b>	<b>80,9</b>	<b>4,47</b>	<b>5,78</b>	<b>0,34</b>	<b>2,74</b>	<b>4,11</b>	<b>6,11</b>
<b>Мин</b>	<b>118</b>	<b>1,52</b>	<b>48,1</b>	<b>2,45</b>	<b>1,32</b>	<b>0,11</b>	<b>0,11</b>	<b>0,92</b>	<b>2,58</b>
<b>Макс</b>	<b>278</b>	<b>9,34</b>	<b>100</b>	<b>6,75</b>	<b>13,8</b>	<b>0,51</b>	<b>5,17</b>	<b>7,17</b>	<b>9,14</b>
<b>М-К</b>	120	4,14	52,1	1,19	2,21	0,24	2,36	0,46	0,98
<b>М-Р</b>	278	9,31	100	0,95	13,8	0,95	5,89	7,15	7,85
<b>М-П</b>	110	6,65	87,5	4,41	4,21	0,74	3,26	5,32	4,58
<b>С.В</b>	<b>189</b>	<b>6,71</b>	<b>79,8</b>	<b>2,09</b>	<b>6,73</b>	<b>0,64</b>	<b>3,83</b>	<b>4,31</b>	<b>4,47</b>
<b>Мин</b>	<b>110</b>	<b>4,14</b>	<b>52,1</b>	<b>0,95</b>	<b>2,21</b>	<b>0,24</b>	<b>2,36</b>	<b>0,46</b>	<b>0,98</b>
<b>Макс</b>	<b>278</b>	<b>9,31</b>	<b>100</b>	<b>4,41</b>	<b>13,8</b>	<b>0,95</b>	<b>5,89</b>	<b>7,15</b>	<b>7,85</b>

ДХБК=Дихидроксибензоева киселина

С.В: средна вредност

Мин: Минимална вредност

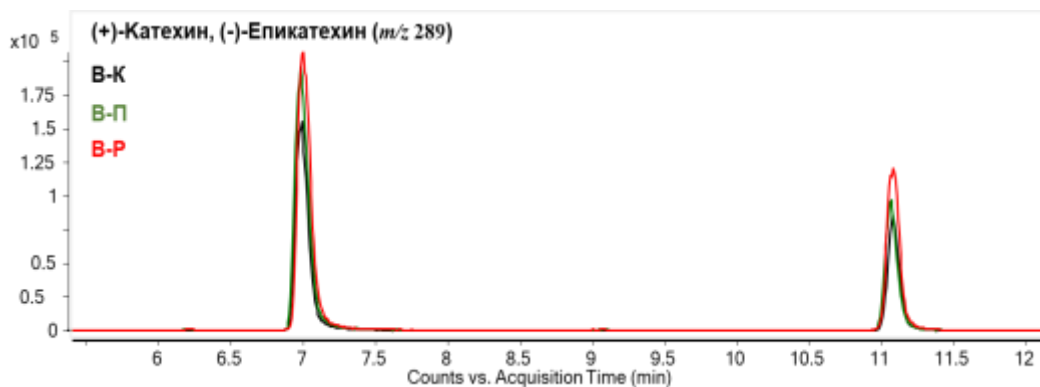
Макс: Максимална вредност

В-К: вино Вранец добиено со класична метода на ферментација, В-Р: вино Вранец добиено со рото метода на ферментација, В-П: вино Вранец добиено со punchdown метода на ферментација.

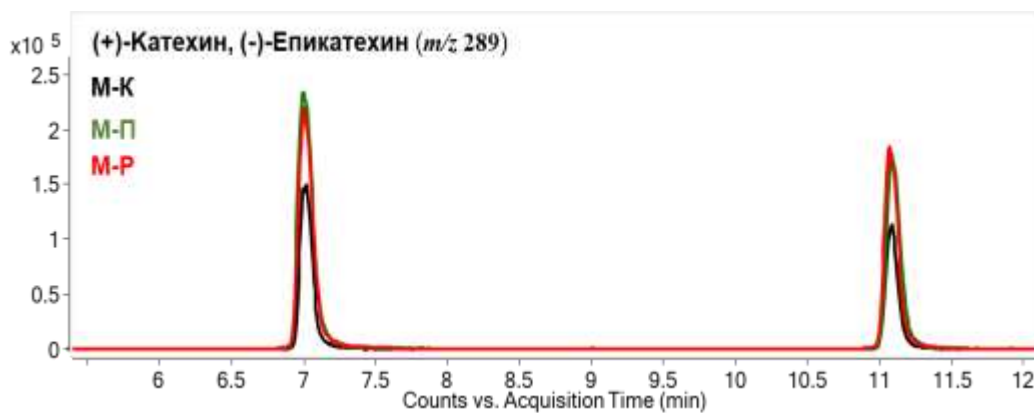
М-К: вино Мерло добиено со класична метода, М-Р: вино Мерло добиено со рото метода, М-П: вино Мерло добиено со punchdown метода на ферментација.

Другите полифеноли, вклучувајќи ги флаван-3-олите, антоцијаните и пираноантоцијаните, беа определени со семиквантификација, бидејќи немавме стандарди за конструирање на калибрациони криви. При тоа, семиквантификацијата беше извршена со пресметување на површините на екстрахираните пиковите за секоја компонента поединечно.

На слика 30 се прикажани екстрахирани јонски хроматограми на  $m/z$  289 за соединенијата (+)-катехин и (-)-епикатехин добиени во негативен јонски мод за вината Вранец и Мерло за секоја метода на ферментација (класична, рото и метода на потиснување). Површината и интензитетот на пиковите за (+)-катехин и (-)-епикатехин се најголеми во виното Вранец и виното Мерло произведени со рото метода на ферментација, а најмали во вината добиени со класична метода на ферментација.



а)



б)

Слика 30. Интензитет и површина на пиковите на (+)-катехин и (-)-епикатехин мерени во негативен јонски мод, а) вина од сортата Вранец, б) вина од сортата Мерло

Picture 30. Peak area and intensity for (+)-catechin and (-)-epicatechin measured in negative ion mode, a-Vranec, b-Merlot

В-К: Вино Вранец добиено со класична метода на ферментација, В-Р: Вино Вранец добиено со рото метода на ферментација, В-П: Вино Вранец добиено со punchdown метода на ферментација.

М-К: Вино Мерло добиено со класична метода, М-Р: Вино Мерло добиено со рото метода, М-П: Вино Мерло добиено со punchdown метода на ферментација.

Површините на пиковите за секоја поединечна компонента идентификувана во примероците вино Вранец и Мерло се прикажани во табела 14 и табела 15, соодветно.

Табела 14. Површина на пикови на идентификуваните фенолни компоненти во вина од сортата Вранец

Table 14. Peak areas of the identified phenolic components in Vranec wines

Компонента	Површина на пик					
	В-К	$\pm SD$	В-П	$\pm SD$	В-П	$\pm SD$
<b>Фенолни киселини</b>						
<i>Хидроксибензоени киселини</i>						
Гална киселина	1401296	$\pm 626$	1782569	$\pm 570$	1495241	$\pm 717$
3,4-Дихидоксибензоена киселина	144111	$\pm 11520$	201587	$\pm 687$	278951	$\pm 774$
Сиригинска киселина	1028320	$\pm 64250$	2583541	$\pm 16455$	1458661	$\pm 6993$
<b>Средна вредност</b>	<b>857909</b>	<b><math>\pm 45820</math></b>	<b>1522565</b>	<b><math>\pm 24556</math></b>	<b>993932</b>	<b><math>\pm 7541</math></b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>144111</b>	<b><math>\pm 11520</math></b>	<b>201587</b>	<b><math>\pm 687</math></b>	<b>278951</b>	<b><math>\pm 774</math></b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>1401296</b>	<b><math>\pm 626</math></b>	<b>2583541</b>	<b><math>\pm 16455</math></b>	<b>1495241</b>	<b><math>\pm 6993</math></b>
<i>Хидроксициметни киселини</i>						
Синапинска киселина	24712	$\pm 574$	92417	$\pm 212$	48571	$\pm 224$
Кафена киселина	800416	$\pm 627$	900597	$\pm 425$	745698	$\pm 706$
p-Кумарна киселина	795000	$\pm 5701$	957658	$\pm 6098$	547896	$\pm 2120$
Ферулна киселина	351138	$\pm 2064$	789156	$\pm 1087$	452145	$\pm 707$
Кафтарна киселина	745562	$\pm 38757$	1078521	$\pm 68589$	935417	$\pm 2873$
p-Кутарна киселина	112583	$\pm 578$	250478	$\pm 643$	105871	$\pm 295$
<b>Средна вредност</b>	<b>471568</b>	<b><math>\pm 3701</math></b>	<b>678137</b>	<b><math>\pm 2087</math></b>	<b>545945</b>	<b><math>\pm 606</math></b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>24712</b>	<b><math>\pm 574</math></b>	<b>92417</b>	<b><math>\pm 212</math></b>	<b>48571</b>	<b><math>\pm 224</math></b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>800416</b>	<b><math>\pm 627</math></b>	<b>1078521</b>	<b><math>\pm 68589</math></b>	<b>935417</b>	<b><math>\pm 2873</math></b>
<b>Флавоноли</b>						
Кверцетин-3-глу	589921	$\pm 4251$	958741	$\pm 785$	666521	$\pm 2119$
Кверцетин-3-глу	326609	$\pm 1058$	847569	$\pm 1506$	625660	$\pm 941$
Мирицетин-3-глу	11258	$\pm 222$	18954	$\pm 147$	13885	$\pm 72$
Кверцетин	79934	$\pm 577$	97456	$\pm 381$	101358	$\pm 1484$
Мирицетин-3-глу	226571	$\pm 222$	354698	$\pm 147$	198547	$\pm 707$
Мирецитин	79934	$\pm 577$	97456	$\pm 381$	101358	$\pm 1484$
Ларицитрин-3-глу	42879	$\pm 577$	90888	$\pm 141$	74111	$\pm 627$
<b>Средна вредност</b>	<b>183930</b>	<b><math>\pm 2251</math></b>	<b>340561</b>	<b><math>\pm 506</math></b>	<b>241776</b>	<b><math>\pm 102</math></b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>11258</b>	<b><math>\pm 222</math></b>	<b>15654</b>	<b><math>\pm 165</math></b>	<b>12354</b>	<b><math>\pm 432</math></b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>589921</b>	<b><math>\pm 4251</math></b>	<b>958741</b>	<b><math>\pm 785</math></b>	<b>666521</b>	<b><math>\pm 2119</math></b>
<b>Дихидрофлавоноли</b>						
Астилбин	236099	$\pm 2100$	289324	$\pm 989$	266512	$\pm 1042$
Дихидромирицетин-3-О-рам	159896	$\pm 707$	175369	$\pm 1504$	198755	$\pm 799$
<b>Средна вредност</b>	<b>207295</b>	<b><math>\pm 2012</math></b>	<b>387823</b>	<b><math>\pm 788</math></b>	<b>262239</b>	<b><math>\pm 201</math></b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>159896</b>	<b><math>\pm 707</math></b>	<b>175369</b>	<b><math>\pm 1504</math></b>	<b>198755</b>	<b><math>\pm 799</math></b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>236099</b>	<b><math>\pm 2100</math></b>	<b>698777</b>	<b><math>\pm 785</math></b>	<b>321451</b>	<b><math>\pm 1116</math></b>
<b>Флаван-3-оли</b>						
(еип)-Катехин-3-О-глу	1235478	$\pm 35440$	254796	$\pm 3606$	124789	$\pm 123$
Катехин-3-О-гал	65477	$\pm 700$	98444	$\pm 2222$	58874	$\pm 1117$
Галокатехин	159638	$\pm 460$	178921	$\pm 730$	123655	$\pm 233$
Процијанидин В2	163581	$\pm 3535$	265478	$\pm 784$	458741	$\pm 709$
Процијанидин В3	1212985	$\pm 6362$	2516897	$\pm 28922$	1472312	$\pm 2121$



(+)-Катехин	1088706	± 1441	1895561	± 2100	1022490	± 1011
Процијанидин В4	661969	± 5652	879365	± 707	947984	± 717
Процијанидин В1	1653085	± 1051	2988005	± 7776	1652148	± 9193
(-)-Епикатехин	502510	± 4949	789547	± 6361	741251	± 5663
(-)-Епикатехин-3-О-гал	12536	± 298	28456	± 701	13547	± 280
<b>Средна вредност</b>	<b>634682</b>	<b>± 198</b>	<b>959113</b>	<b>± 1100</b>	<b>630658</b>	<b>± 2011</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>12536</b>	<b>± 298</b>	<b>28456</b>	<b>± 701</b>	<b>13547</b>	<b>± 280</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>1653085</b>	<b>± 1051</b>	<b>2988005</b>	<b>± 7776</b>	<b>1652148</b>	<b>± 9193</b>
<b>Стилбени</b>						
<i>cis</i> -ресвератрол-3-глу	158742	± 127	254441	± 313	174445	± 108
<i>trans</i> -ресвератрол-3-О-глу	452111	± 627	852241	± 530	356612	± 201
<b>Средна вредност</b>	<b>240658</b>	<b>± 281</b>	<b>550267</b>	<b>± 101</b>	<b>158769</b>	<b>± 255</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>111123</b>	<b>± 282</b>	<b>254441</b>	<b>± 313</b>	<b>102251</b>	<b>± 312</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>452111</b>	<b>± 627</b>	<b>852241</b>	<b>± 530</b>	<b>356612</b>	<b>± 201</b>
<b>Антоцијани</b>						
<b>Монолукозиди</b>						
Делф-3-глу	326609	± 275	858796	± 452	335187	± 325
Ција-3-глу	28842	± 709	65487	± 388	44789	± 254
Малв-3-глу	18956391	± 7710	47886004	± 6258	33254741	± 3257
Пету-3-глу	589921	± 651	874125	± 987	812587	± 1001
Пејо-3-глу	4824957	± 658	9358999	± 1102	6125877	± 1256
<b>Средна вредност</b>	<b>4880022</b>	<b>± 244</b>	<b>11636923</b>	<b>± 587</b>	<b>8114636</b>	<b>± 2545</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>28842</b>	<b>± 709</b>	<b>65487</b>	<b>± 388</b>	<b>44789</b>	<b>± 254</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>18956391</b>	<b>± 7710</b>	<b>47886004</b>	<b>± 6258</b>	<b>33254741</b>	<b>± 3257</b>
<b>Ацетилглукозиди</b>						
Пету-3-ацетилглу	281859	± 709	956987	± 811	325417	± 254
Делф-3-ацетилглу	2145871	± 7120	6987444	± 8004	2224456	± 2247
Ција-3-ацетилглу	587741	± 178	741235	± 473	458771	± 587
Пејо-3-ацетилглу	1388833	± 813	2563451	± 888	1104558	± 104
Малв-3-ацетилглу	5875502	± 782	8775011	± 572	6011123	± 458
<b>Средна вредност</b>	<b>2055961</b>	<b>± 278</b>	<b>4004825</b>	<b>± 1204</b>	<b>2024865</b>	<b>± 1255</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>587741</b>	<b>± 178</b>	<b>741235</b>	<b>± 473</b>	<b>325417</b>	<b>± 254</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>5875502</b>	<b>± 782</b>	<b>8775011</b>	<b>± 572</b>	<b>2224456</b>	<b>± 2247</b>
<b><i>p</i>-Кумароилглукозиди</b>						
Пету-3- <i>p</i> -кумароилглу	3856	± 301	9452	± 852	5471	± 471
Ција-3- <i>p</i> -кумароилглу	100755	± 707	184541	± 702	154789	± 547
Делф-3- <i>p</i> -кумароилглу	1091626	± 7071	9547	± 6119	4523541	± 5237
Пејо-3- <i>p</i> -кумароилглу	6558	± 813	2563451	± 888	1104558	± 104
Малв-3- <i>p</i> -кумароилглу	1388833	± 285	6641235	± 552	4523541	± 984
<b>Средна вредност</b>	<b>5183251</b>	<b>± 1200</b>	<b>1881645</b>	<b>± 2400</b>	<b>1159668</b>	<b>± 2241</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>3856</b>	<b>± 301</b>	<b>9452</b>	<b>± 852</b>	<b>5471</b>	<b>± 471</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>1388833</b>	<b>± 813</b>	<b>6641235</b>	<b>± 6119</b>	<b>4523541</b>	<b>± 5237</b>
<b>Кафеоилглукозиди</b>						
Мал-3-кафеоилглу	325877	± 3011	789653	± 4522	425819	± 5474
Пејо-3-кафеоилглу	215563	± 710	884761	± 987	56923	± 371
Пету-3-кафеоилглу	2856	± 288	5699	± 452	4888	± 478
<b>Средна вредност</b>	<b>116765</b>	<b>± 1111</b>	<b>560037</b>	<b>± 2258</b>	<b>162543</b>	<b>± 4202</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>2856</b>	<b>± 288</b>	<b>5699</b>	<b>± 452</b>	<b>4888</b>	<b>± 478</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>325877</b>	<b>± 710</b>	<b>789653</b>	<b>± 4522</b>	<b>425819</b>	<b>± 5474</b>
<b>Карбокси-пирано-антоцијани</b>						
Карбокси-пирано-малв-3-глу	698222	± 1022	254713	± 2228	125896	± 2581
Карбокси-пирано-малв-3- <i>p</i> -кумароилглу	25741	± 198	88465	± 254	34557	± 401
Карбоксип-пирано-3-ацетилглу	125574	± 258	624912	± 1322	354122	± 255
Карбокси-пирано-пеј-3-глу	4123	± 124	9456	± 233	6987	± 125
<b>Средна вредност</b>	<b>213415</b>	<b>± 102</b>	<b>244386</b>	<b>± 212</b>	<b>130390</b>	<b>± 1080</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>4123</b>	<b>± 124</b>	<b>9456</b>	<b>± 233</b>	<b>6987</b>	<b>± 125</b>

Максимална вредност	698222	± 1022	624912	± 1322	354122	± 255
<b>Пираноантоцијани</b>						
Пирано-малв-3-глу	146698	± 875	198741	± 551	155213	± 585
Пирано-малв-3-ацетилглу	58524	± 1588	96123	± 2101	65853	± 987
Пирано-малв-3-р-кумароилглу	135412	± 254	174900	± 1002	158221	± 874
<b>Средна вредност</b>	<b>113444</b>	<b>± 115</b>	<b>156579</b>	<b>± 155</b>	<b>126429</b>	<b>± 541</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>58524</b>	<b>± 875</b>	<b>96123</b>	<b>± 551</b>	<b>65853</b>	<b>± 585</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>146698</b>	<b>± 1588</b>	<b>198741</b>	<b>± 2101</b>	<b>158221</b>	<b>± 874</b>

В-К: Вино Вранец добиено со класична метода на ферментација, В-Р: Вино Вранец добиено со рото метода на ферментација, В-П: Вино Вранец добиено со punchdown метода на ферментација. Резултатите се средни вредности од три повторувања ± SD (стандардна девијација)  
Кратенки: глу-глукозид, глур-глукоронид, гал-галат, рам-рамнозид, ван-ванилат, ацетилглу-ацетилглукозид, кумароилглу-кумароилглукозид, мал-малвидин, прџо-пејонидин, пету-петнидин, делф-делфинидин, ција-цијанидин

Табела 15. Површина на пикови на идентификуваните фенолни компоненти во вина од сортата Мерло

Table 15. Peak areas of identified phenolic components in Merlot wines

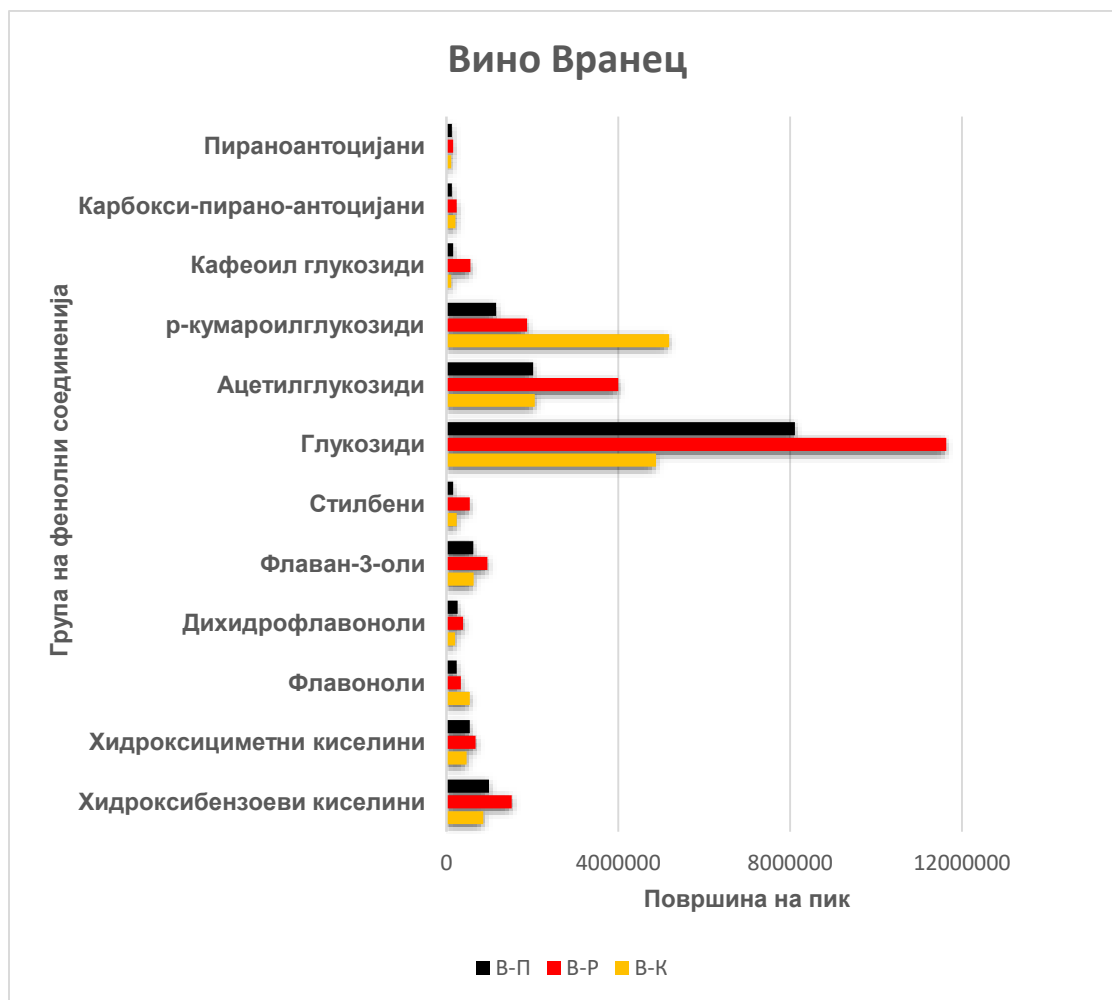
Компонента	Површина на пик					
	М-К	±SD	М-Р	±SD	М-П	±SD
<b>Фенолни киселини</b>						
<i>Хидроксибензоени киселини</i>						
Гална киселина	1268824	± 5471	1754471	± 2514	1482100	± 3254
3,4-Дихидоксибензоена киселина	284585	± 954	574123	± 874	444231	± 625
Сирингинска киселина	610451	± 455	950147	± 287	741245	± 666
<b>Средна вредност</b>	<b>721286</b>	<b>± 125</b>	<b>1092913</b>	<b>± 1200</b>	<b>889192</b>	<b>± 1400</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>610451</b>	<b>± 455</b>	<b>574123</b>	<b>± 874</b>	<b>444231</b>	<b>± 625</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>1268824</b>	<b>± 5471</b>	<b>1754471</b>	<b>± 2514</b>	<b>1482100</b>	<b>± 3254</b>
<i>Хидроксициметни киселини</i>						
Синапинска кисечина	24179	± 427	32549	± 255	14725	± 128
Кафена киселина	123330	± 1200	165417	± 655	142211	± 542
р-Кумарна киселина	33987	± 1687	45217	± 1247	248125	± 987
Ферулна киселина	463904	± 1520	578413	± 1002	214587	± 1201
Кафтарна киселина	123330	± 1200	165417	± 655	142211	± 542
р-Кутарна киселина	23477	± 577	40789	± 125	22178	± 148
<b>Средна вредност</b>	<b>132034</b>	<b>± 1420</b>	<b>171300</b>	<b>± 1111</b>	<b>130672</b>	<b>± 245</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>23477</b>	<b>± 577</b>	<b>32549</b>	<b>± 255</b>	<b>14725</b>	<b>± 128</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>463904</b>	<b>± 1520</b>	<b>578413</b>	<b>± 1002</b>	<b>248125</b>	<b>± 987</b>
<b>Флавоноли</b>						
Кверцетин-3-глур	152943	± 1520	345211	± 2101	215210	± 1487
Кверцетин-3-глу	2220	± 421	7540	± 147	62471	± 421
Мирицетин-3-глур	41258	± 988	95874	± 459	66625	± 187
Кверцетин	191590	± 2401	203623	± 1897	174256	± 1300
Мирицетин-3-глу	98170	± 1564	104789	± 1120	87412	± 658

Ларицитрин-3-глу	1478961	± 322	2227136	± 189	1854718	± 245
<b>Средна вредност</b>	<b>283779</b>	<b>± 1400</b>	<b>430941</b>	<b>± 1440</b>	<b>355204</b>	<b>± 255</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>2220</b>	<b>± 421</b>	<b>7540</b>	<b>± 147</b>	<b>25741</b>	<b>± 457</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>1478961</b>	<b>± 322</b>	<b>2227136</b>	<b>± 189</b>	<b>1854718</b>	<b>± 245</b>
<b>Дихидрофлавоноли</b>						
Астилбин	78269	± 147	44218	± 241	22156	± 241
Дихидромирицетин-3-О-рам	21861	± 1236	35124	± 994	12365	± 1478
<b>Средна вредност</b>	<b>55334</b>	<b>± 123</b>	<b>58631</b>	<b>± 1001</b>	<b>32514</b>	<b>± 178</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>21861</b>	<b>± 1236</b>	<b>35124</b>	<b>± 994</b>	<b>74123</b>	<b>± 125</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>78269</b>	<b>± 147</b>	<b>96552</b>	<b>± 698</b>	<b>22156</b>	<b>± 241</b>
<b>Флаван-3-оли</b>						
(еџи)-Катехин-3-О-глу	554888	± 1474	874122	± 1220	310020	± 222
Катехин-3-О-гал	555897	± 2487	969441	± 1224	321555	± 254
Галокатехин	456987	± 521	324587	± 222	958741	± 142
Процијанидин В2	1489780	± 1223	1855210	± 2441	1684321	± 1400
Процијанидин В3	952465	± 3541	1102547	± 352	958741	± 987
(+)-Катехин	1022490	± 1524	1500621	± 4205	1321550	± 2854
Процијанидин В4	714002	± 1500	1002589	± 2221	1200369	± 2874
Процијанидин В1	1334072	± 4588	2452087	± 1500	1655210	± 2020
(-)-Епикатехин	753846	± 2587	9874123	± 3201	8843117	± 1287
(-)-Епикатехин-3-О-гал	76822	± 354	42584	± 153	98425	± 329
<b>Средна вредност</b>	<b>664838</b>	<b>± 3412</b>	<b>178697</b>	<b>± 2200</b>	<b>131186</b>	<b>± 1450</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>76822</b>	<b>± 125</b>	<b>42584</b>	<b>± 153</b>	<b>48951</b>	<b>± 243</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>1489780</b>	<b>± 1223</b>	<b>9874123</b>	<b>± 3201</b>	<b>8843117</b>	<b>± 1287</b>
<b>Стилбени</b>						
<i>cis</i> -ресвератрол-3-глу	25874	± 1471	65477	± 1074	42148	± 985
<i>trans</i> -ресвератрол-3-О-глу	625477	± 322	978211	± 126	415587	± 477
<b>Средна вредност</b>	<b>325675</b>	<b>± 222</b>	<b>521844</b>	<b>± 2630</b>	<b>228867</b>	<b>± 110</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>25874</b>	<b>± 322</b>	<b>65477</b>	<b>± 126</b>	<b>42148</b>	<b>± 477</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>625477</b>	<b>± 147</b>	<b>978211</b>	<b>± 244</b>	<b>415587</b>	<b>± 985</b>
<b>Антоцијани</b>						
<b>Моноглукозиди</b>						
Делф-3-глу	37635	± 258	204483	± 1447	113266	± 2111
Џија-3-глу	7542	± 165	10123	± 241	35526	± 322
Малв-3-глу	2340643	± 714	2151074	± 1004	1155711	± 1200
Пету-3-глу	152943	± 1477	401335	± 1004	178468	± 256
Пејо-3-глу	37716	± 256	49651	± 147	35417	± 320
<b>Средна вредност</b>	<b>515295</b>	<b>± 568</b>	<b>563333</b>	<b>± 768</b>	<b>303677</b>	<b>± 841</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>7542</b>	<b>± 165</b>	<b>10123</b>	<b>± 241</b>	<b>35417</b>	<b>± 1200</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>2340643</b>	<b>± 256</b>	<b>2151074</b>	<b>± 147</b>	<b>1155711</b>	<b>± 320</b>
<b>Ацетилглукозиди</b>						
Пету-3-ацетилглу	1654	± 851	6075	± 252	2350	± 102
Делф-3-ацетилглу	15632	± 162	82314	± 714	25877	± 258
Џија-3-ацетилглу	12829	± 9551	180402	± 8411	152874	± 2566

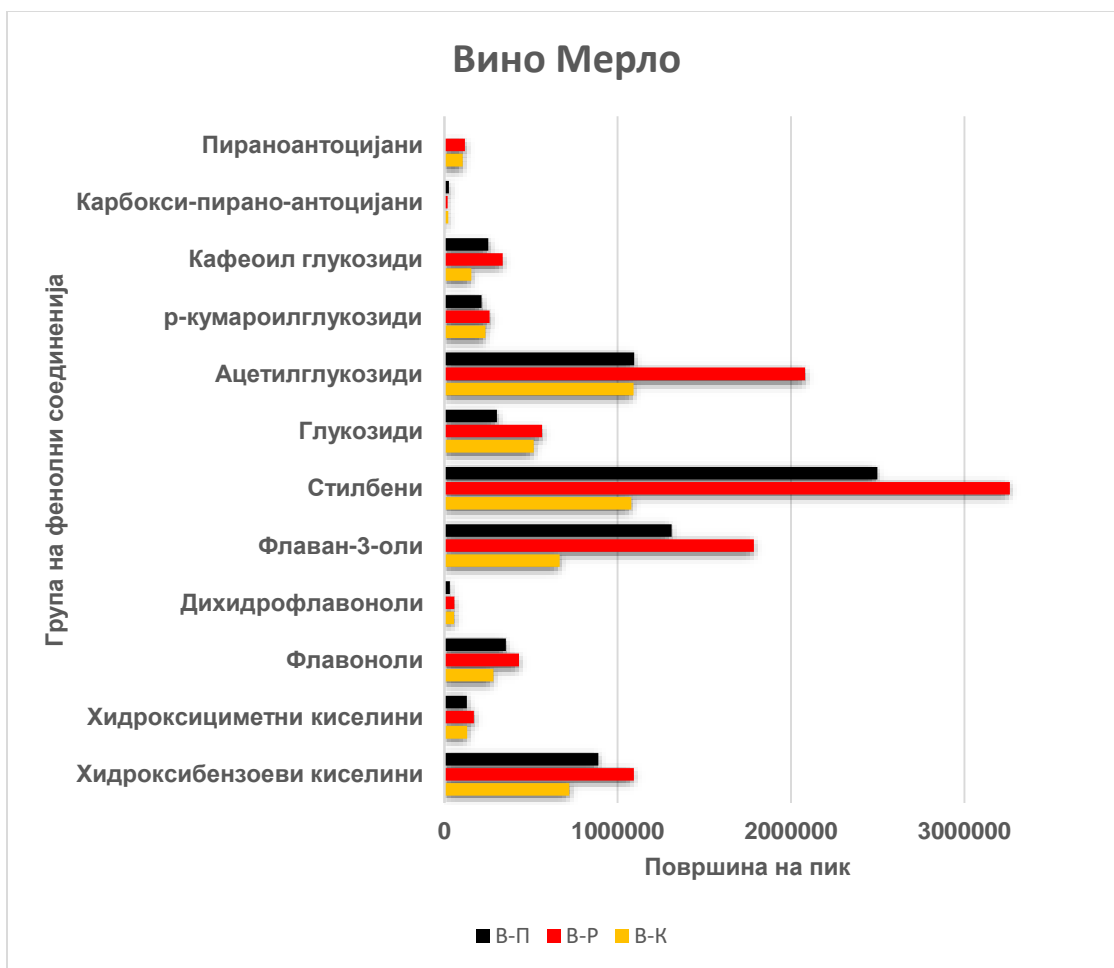
Пејо-3-ацетилглу	17674	± 888	44072	± 147	22834	± 104
Малв-3-ацетилглу	5412336	± 541	8471252	± 1554	5274592	± 987
<b>Средна вредност</b>	<b>1092025</b>	<b>± 2398</b>	<b>2080823</b>	<b>± 2215</b>	<b>1095705</b>	<b>± 803</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>1654</b>	<b>± 851</b>	<b>6075</b>	<b>± 252</b>	<b>2350</b>	<b>± 102</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>5412336</b>	<b>± 9551</b>	<b>8471252</b>	<b>± 8411</b>	<b>5274592</b>	<b>± 2566</b>
<b><i>р-Кумароилглукозиди</i></b>						
Пету-3-р-кумароилглу	2356	± 125	10996	± 452	4032	± 103
Ција-3-р-кумароилглу	14881	± 411	22821	± 129	10194	± 101
Делф-3-р-кумароилглу	36010	±1220	281110	± 954	55214	± 421
Пејо-3-р-кумароилглу	874112	± 1301	24664	± 1896	478552	± 1002
Малв-3-р-кумароилглу	260071	± 287	963258	± 100	529879	± 251
<b>Средна вредност</b>	<b>237486</b>	<b>± 661</b>	<b>260569</b>	<b>± 706</b>	<b>215574</b>	<b>± 376</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>2356</b>	<b>± 125</b>	<b>10996</b>	<b>± 452</b>	<b>4032</b>	<b>± 103</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>260071</b>	<b>± 1220</b>	<b>963258</b>	<b>± 1896</b>	<b>529879</b>	<b>± 421</b>
<b><i>Кафеоилглукозиди</i></b>						
Мал-3-кафеоилглу	444785	± 110	982142	± 104	741231	± 422
Пејо3-кафеоилглу	5878	± 412	7412	± 255	6500	± 123
Пету-3-кафеоилглу	14556	± 2111	19820	± 1230	15900	± 987
<b>Средна вредност</b>	<b>155073</b>	<b>± 877</b>	<b>336458</b>	<b>± 529</b>	<b>254543</b>	<b>± 516</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>5878</b>	<b>± 412</b>	<b>7412</b>	<b>± 255</b>	<b>6500</b>	<b>± 123</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>444785</b>	<b>± 2111</b>	<b>982142</b>	<b>± 255</b>	<b>741231</b>	<b>± 987</b>
<b><i>Карбокси-пирано-антоцијани</i></b>						
Карбокси-пирано-малв-3-глу	36010	± 287	24664	± 100	55214	± 251
Карбокси-пирано-малв-3-р-кумароилглу	4789	± 452	8541	± 201	6247	± 147
Карбоксип-пирано-3-ацетилглу	14723	± 154	16321	± 312	15996	± 215
Карбокси-пирано-пеј-3-глу	25441	± 988	30258	± 1000	27412	± 142
<b>Средна вредност</b>	<b>22080</b>	<b>± 470</b>	<b>19946</b>	<b>± 403</b>	<b>26217</b>	<b>± 188</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>4789</b>	<b>± 452</b>	<b>8541</b>	<b>± 201</b>	<b>6247</b>	<b>± 147</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>36010</b>	<b>± 287</b>	<b>24664</b>	<b>± 100</b>	<b>55214</b>	<b>± 251</b>
<b><i>Пираноантоцијани</i></b>						
Пирано-малв-3-глу	288853	± 155	322256	± 663	272147	± 120
Пирано-малв-3-ацетилглу	15328	± 1456	16357	± 1241	13228	± 1120
Пирано-малв-3-р-кумароилглу	12391	± 101	16931	± 1001	14200	± 201
<b>Средна вредност</b>	<b>105524</b>	<b>± 570</b>	<b>118514</b>	<b>± 968</b>	<b>1001</b>	<b>± 480</b>
<b>Минимална вредност</b>	<b>12391</b>	<b>± 101</b>	<b>16357</b>	<b>± 663</b>	<b>13228</b>	<b>± 120</b>
<b>Максимална вредност</b>	<b>288853</b>	<b>± 1456</b>	<b>322256</b>	<b>± 1241</b>	<b>272147</b>	<b>± 1120</b>

В-К: Вино Вранец добиено со класична метода на ферментација, В-Р: Вино Вранец добиено со рото метода на ферментација, В-П: Вино Вранец добиено со runchdown метода на ферментација. Резултатите се средни вредности од три повторувања ± SD (стандардна девијација)  
Кратенки: глу-глукозид, глур-глукоронид, гал-галат, рам-рамнозид, ван-ванилат, ацетилглу-ацетилглукозид, кумароилглу-кумароилглукозид, мал-малвидин, прјо-пејонидин, пету-петнидин, делф-делфинидин, ција-цијанидин

Средни вредности од површините на пикови кои ја покажуваат релативната содржина на различните групи на феноли во вината Вранец добиени со класична, рото и punchdown метода се прикажани на слика 31. На слика 32 се прикажани средните вредности на површините на пикови за секоја фенолна група на соединенија кај вината Мерло и тоа одделно за секоја метода на винификација.



Слика 31. Средни вредности на површините на пикови за различните фенолни групи за виното Вранец добиено со класична, рото и метода на потиснување  
 Figure 31. Mean values of peak areas for different phenolic groups for Vranec wine obtained by classic, roto and punchdown methods



Слика 32. Средни вредности на површините на пикови за различните фенолни групи за виното Мерло добиено со класична, рото и метода на потиснување  
 Figure 32. Mean values of peak areas for different phenolic groups for Merlot wine obtained by classic, roto and punchdown methods

Во однос на сортата, беше утврдено дека поголема содржина на феноли (фенолни киселини, флавоноли, флаван-3-оли, дихидрофлавоноли, стилбени и антоцијани) има во вината од сортата Вранец во однос на вината од сортата Мерло, без разлика на типот на применет ферментатор (слика 28, слика 29). Овие резултати се во согласност со претходни истражувања за влијанието на сортата врз полифенолниот состав на вино (Ivanova et al., 2009, Ivanova et al., 2012) во кои е утврдено дека вината од сортата Вранец се карактеризираат со висока содржина

на полифеноли. Во однос на методата на ферментација беше забележано дека најефикасна екстракција на полифенолните компоненти се постигнува кај вината од двете сорти произведени со рото метода, а најниска кај вината произведени со класична метода на ферментација.

Така, најголема релативна содржина на хидроксибензоени и хидроксициметни киселини е утврдена за двете сорти на вино произведени со рото метода на ферментација, а најмала во вината произведени со класичен метод на ферментација. Колку е подобар контактот помеѓу зрната од грозје и ширата толку и екстракцијата на хидроксибензоевите киселини е поголема. Кај рото методата овој контакт помеѓу зрната и ширата е најголем, најконтинуиран, неагресивен и се одвива континуирано по целата должина на рото ферментаторот. Како резултат на тоа и екстракцијата на хидроксибензоевите киселини со рото метод на ферментација е најголем. Притоа, беше забележано дека содржината на хидроксибензоевите киселини е поголема од содржината на хидроксициметните киселини и кај двете сорти на вино.

Од групата на флавоноли, беа определени вкупно 6 (шест) соединенија: мирицетин-3-глукозид, кверцетин-3-глукозид, ларицитрин-3-глукозид, мирицетин-3-глукуронид, кверцетин-3-глукуронид и кверцетин. Најголема релативна содржина на флавонолите беше измерена во вината добиени со рото методата на ферментација, а најмала содржина во вината од двете сорти на вино произведени со класична метода на ферментација. Кај виното од сортата Вранец доминантен флавонол е кверцетин-3-глукуронид, а најмала содржина беше измерена за мирицетин-3-глукуронид. Кај виното од сортата Мерло најдоминантен флавонол е ларицитрин-3-глукозид, а најмала содржина беше измерена за кверцетин-3-глукозид. Во однос на сортата, поголема содржина на флавоноли беше измерена кај вината Мерло во однос на сортата Вранец.

Флаван-3-олите во вино постојат како мономери: (-)-епикатехин, (+)-катехин, (+)-епигалокатехин и (-)-епикатехин-3-О-галат (Wu et al., 2006). Флаван-3-оли се лоцирани во семките од грозјето во тенок клеточен слој помеѓу екстерните хидрофобни кутикули и внатрешните лигнифицирани слоеви. Во лушпите флаван-3-олите се лоцирани во дебел внатрешен слој на хиподермисот (Adams, 2006).

Затоа, колку е поголем контактот помеѓу семките и лушките од грозјето со ширата толку и екстракцијата на флаван-3-олите ќе биде поголема. Во нашето истражување беа определени 11 (единаесет) флаван-3-оли. Најголема содржина на флаван-3-оли беше определена за вината Вранец и Мерло произведени со рото метода на ферментација, проследено со вината добиени со метода на потиснување. Најмала содржина на флаван-3-оли беше измерена во вината добиени со класична метода на ферментација. Доминантен флаван-3-ол во вината од сортата Вранец е процијанидин В1, додека во сортата Мерло доминира процијанидин В2. Најмала содржина беше детектирана за (-)-епикатехин-3-О-галат и кај двете сорти на вино Вранец и Мерло. И за оваа група на соединенија беше забележано дека вината произведени со рото ферментација содржат најмногу флаван-3-оли што е во согласност со литературните податоци (Su & Singleton, 1969; Pantelić et al., 2016).

Стилбените се соединенија кои се синтетизираат во грозјето, главно во лушките, како резултат на процеси на одбрана од микробиолошки инфекции и заштита на зрната од UV зрачење (Sun et al., 2011). Од групата на стилбени беа определени *cis*-ресвератрол-3-глукозид и *trans*-ресвератрол-3-глукозид (уште се нарекуваат и *cis*-пицеид и *trans*-пицеид). Притоа, содржината на *trans*-ресвератрол-3-О-глукозид беше поголема во споредба со содржината на *cis*-ресвератрол-3-О-глукозид и кај двете сорти на вино, и Вранец и Мерло. Најголема содржина на стилбени беше измерена во вината Вранец и Мерло произведени со рото метода на ферментација, а најмала содржина во вината добиени со класична метода на ферментација (табела 12; табела 13). Слично како и за другите соединенија, со рото методата се постигнува подобра екстракција и на стилбени поради тоа што се овозможува подобар контакт на лушките со гроздовиот сок во кој преминуваат компонентите.

Најголемата и најзначајна група на феноли се антоцијаните. Во ова истражување беа определени вкупно 17 (седумнаесет) антоцијани и тоа во форма на моноглукозиди, ацетилглукозиди и *p*-кумароилглукозиди и кафеоилглукозиди. Во грозјето антоцијаните се присутни во епидермалните и првите слоеви од субепидермалните клетки на ткивото од лушката, и тоа како слободни некомплексирани сферични вакуоларни групации со дијаметар од 10-15  $\mu\text{m}$  (Mizuno



et al., 2006). Поради нивната вакуоларна локација, дифузијата на антоцијаните во ширата бара усогласена деградација на две биолошки бариери, и тоа разградување на клеточниот ѕид како и ослободување на пектолитичките ензими во средната и внатрешната ламела и тонопластот (Amarni et al., 1994). Процесот на дифузија е фаворизиран од природната растворливост на антоцијаните во вода, при што најголема екстракција на антоцијаните се постигнува од третиот до шестиот ден од мацерацијата (Harbertson et al., 2009; Ivanova-Petropulos et al., 2015). Во ова истражување најголема содржина на моноглукозиди беше измерена кај вината Вранец и Мерло добиени со рото метода на ферментација. Доминантен моноглукозид во вината од двете сорти е малвидин-3-глукозидот, што е во согласност со литературните податоци (Ivanova et al., 2011; Spranger et al., 2004), додека најмала содржина беше определена за цијанидин-3-глукозид и за двете сорти на вино. Споредено по сорти, содржината на моноглукозиди е поголема кај вината од сортата Вранец во споредба со содржината на моноглукозиди кај сортата Мерло. Ова е како резултат на карактеристиките на сортата, Вранец како сорта дава вина со побогата содржина на моноглукозиди. Содржината на ацетилглукозидите е најголема и кај двете сорти на вино Вранец и Мерло произведени со рото метода на ферментација, а најниска содржина на ацетилглукозиди беше измерена кај вината добиени со класична метода на ферментација. Најзастапен ацетилглукозид кај виното Вранец е малвидин-3-ацетилглукозидот а најмала содржина беше измерена за цијанидин-3-ацетилглукозид. Споредено по сорти на вино, поголема содржина на ацетилглукозиди има во вината од сортата Вранец во споредба со вината од сортата Мерло што е во склад со литературните податоци (Ivanova et al., 2012).

Содржината на *p*-кумароилглукозиди и кафеоилглукозидите е поголема кај двете сорти на вино произведени со рото метода на ферментација. Од групата на *p*-кумароилглукозиди, доминантен и кај двете сорти на вино е малвидин-3-*p*-кумароилглукозид. Најзастапен кафеоилглукозид кај виното Вранец и виното Мерло е малвидин-3-кафеоилглукозид.

Причина за најголемата содржина на моноглукозиди, ацетилглукозиди, *p*-кумароилглукозиди и кафеоилглукозиди во вината добиени со рото ферментација

е континуираниот и неагресивен контакт на лушпите од грозјето со ширата, а со тоа се постигнува поголема екстракција, што резултира и со поголема содржина на овие фенолни групи на соединенија. При pinch-down методата, екстракцијата на моноглукозиди, ацетилглукозиди, *p*-кумароилглукозиди и кафеоилглукозиди е помала бидејќи контактот помеѓу лушпите и ширата е периодичен и настанува во моментот на кршење на формираната капа од семки и лушпи со помош на клипот на ферментаторот и нивно потиснување во ширата. Кај вината добиени со класичната метода на ферментација, содржината на моноглукозиди, ацетилглукозиди, *p*-кумароилглукозиди и кафеоилглукозиди е најмала и кај двете сорти на вино и ова е како резултат на неефикасното мешање на лушпите и семките со ширата како резултат на што повеќе антоцијани остануваат во комињето.

Соединенијата кои се формираат со реакција на циклична адиција на антоцијаните со пирогрoздова киселина се нарекуваат карбокси-пирано антоцијани. Во нашето истражување беа семиквантифицирани 4 (четири) карбокси-пирано антоцијани. Доминантен карбокси-пирано антоцијан и кај двете сорти на вино Вранец и Мерло е карбокси-пирано-малвидин-3-глукозид. Споредено по сорти на вино беше утврдено дека во вината Вранец содржината на карбокси-пирано-антоцијаните е поголема во споредба со нивната содржина во вината од сортата Мерло и е во согласност со податоците од литературата (Ivanova et al., 2011). Во однос на типот на ферментација, најголема содржина на карбокси-пирано антоцијани е измерена во вината Вранец и Мерло произведени со рото ферментација, а најмала содржина на карбокси-пирано антоцијани беше измерена кај вината добиени со класична метода на ферментација. Соединенијата кои се добиваат со реакција на антоцијаните и ацеталдехидот се нарекуваат пирoантоцијани (Fulcard et al., 1998; Busse-Valverde et al., 2011). Во ова истражување беа семиквантифицирани 3 (три) пирoантоцијани и тоа: пирано-малвидин-3-глукозид, пирано-малвидин-3-ацетилглукозид и пирано-малвидин-3-кумароилглукозид. Доминантен пирoантоцијан во примероците вино Вранец и Мерло е пирано-малвидин-3-глукозид. Содржината на пираноантоцијаните е поголема кај вината од сортата Вранец а помала кај вината од сортата Мерло. Во однос на методата на ферментација најголема содржина на пираноантоцијани е семиквантифицирана кај вината Вранец и Мерло добиени со

рото метода на ферментација што е во склад со литературата (Carvalho et al., 2010). Пираноантоцијаните се многу стабилни и отпорни на белење со сулфур диоксид и оксидативна деградација, затоа тие можат значително да придонесат за стабилноста на бојата на црвените вина (De Freitas & Mateus, 2011).

## 5. Заклучок

Во овој магистерски труд беше применета ултрависокоефикасна течна хроматографија поврзана со масен детектор со квадрупол и масен анализатор со време на прелетување (UPLC-QTOF-MS) за анализа на различни групи на феноли во црвени вина од сортата Вранец и Мерло. Вината беа произведени со три методи на ферментација: класична, рото и punch-down. При тоа беше заклучено дека најдобра екстракција на полифеноли од грозјето во виното се постигнува со примена на рото ферментација како резултат на ефикасниот контакт меѓу лушпите и семките од грозјето со ширата, долж целиот рото ферментатор. Вината од двете сорти добиени со рото ферментација имаат највисока содржина на фенолни киселини, флаван-3-оли, флавоноли, дихидрофлавоноли, стилбени, антоцијани и дериватизирани пигменти, со што се постигнува највисок квалитет на вината.

## 6. Користена литература

- Allen, H., Fleming, S. J. (1961). *A History of Wine, Art Flair, Glen Mills, PA.*
- Amerin, M. A., Ough, C. S. (1974). *Wine and Must Analysis, New York, John Wiley & Sons, Inc.*
- Amerine, M. A., Ough, C. S. (1980). *Methods for Analysis of Must and Wines, John Wiley, New York*
- Amarni-Joutei, K., Glories, Y., Mercier, M. (1994). Localization of tannins in grape berry skins, *Vitis*, 33, 38-133.
- Adams, D. O. (2006). Phenolics and ripening in grape berries, *Am. J. Enol. Vitic*, 57, 56-249.
- Bate-Smith, E. C. (1954). Flavonoid compounds in foods, *Food Res*, 5, 262-295.
- Baranowski, J., Nagel, C. W. (1981). Isolation and identification of the hidroxycinnamic acid derivates in white Riesling wine, *Am. J. Enol. Vitic*, 32, 5-13.
- Baum-Baicker, C. (1985). The psychological benefits of moderate alcohol consumption, *Drug Alcohol Depend*, 15, 305-322.
- Baldwin, J., Hyams, E. (1987). Dyonisus, *A Social History of the Wine*, 54, 14-16.
- Bakker, J., Picinelli, A., Bridle, P. (1993). Model Wine solutions: Colour and composition changes during aging, *J. Agric. Food Chem*, 45, 35-43.
- Baldi, A., Romani, A., Mulinacci, N., Vincieri, F. F., Casetta, B. (1995). HPLC/MS application to anthocyanins occurring in some red wines, *J. Agric. Food Chem*, 45, 35-43.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Kunkee, R. E. (1996). *Principles and Practices of Winemaking. Springer, New York.*
- Bakker, J., Timberlake, C. F. (1997). Isolation, identification and characterization of new colour-stable anthocianins occurring in some red wines. *J. Agric. Food Chem*, 45, 35-43.
- Bauer, F. E., Pretorius, I. S. (2000). Yeasts stress response and fermentation efficiency, *Afr. J. Enol. Vitic*, 21, 27-51.
- Burton, B. J., Jacobsen, J. P. (2001). The rate of return on investment in wine, *Econ. Ingury*, 39, 337-350.

- Barbalán, A. M. A., Zorro, L., Guillén, D. A. (2003). Study of the polyphenolic content of red and white grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant power, *J. Chromatogr*, 44, 1012-1013.
- Busse-Valverde, N., Gómez-Plaza, E., López-Roc, J. M., Gil-Muñoz, R., Bautista-Ortín, A. B. (2011). The extraction of anthocyanins and proanthocyanidins from grape to wine during fermentative maceration is affected by the enological technique, *J. Agric. Food Chem*, 59, 5450-5455.
- Blesic, M., Drmac, M., Batinić, K., Spaho, N. (2017). Levels of selected metals in wines from different Herzegovinian viticultural localities, *Croat. J. Food Sci. Technol*, 9, 1-10.
- Божиновиќ, З. (2005). Ампелографија. 2, 117-122
- Bora, F. D., Călugăr, A., Bunea, S., Rosza, S., Bunea, A. (2022). Assessment of Physicochemical, Macro and Microelements, Heavy Metals, and Related Human Health Risk from Organically, Conventionally and Homemade Romanian Wines, *Horticulturae*, 8, 382-389.
- Cheyner, V., Rigaut, J. (1986). HPLC separation and characterization of flavonols in the skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault, *Am. J. Enol. Vitic*, 37, 248-252.
- Chow, H., Gump, B. H. (1987). Phosphorus in wine, comparison of atomic absorption spectrometry methods. *J. Anal. Chem*, 70, 61-63.
- Cook, J.D., Reddy, M. B., Hurrell, R. F. (1995). The effect of red and white wines on nonheme-iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr*, 4, 800-804.
- Carrasco, P., Querol, A., del Olmo, M. (2001). Analysis of the stress resistance of commercial wine yeasts strains, *Arch. Microbiol*, 175, 450-457.
- Castillo-Munoz, N., Gomez-Alonso, S., Garcia-Romero, E., Hermosin-Gutierrez, I. (2007). Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines, *J. Agric. Food. Chem*, 55, 992-1002.
- Carvalho, A. R. F., Oliveira, J., De Freitas, V., Mateus, N., Melo, A. (2010). A theoretical interpretation of the color of two classes of pyroanthocyanins, *J. Mol. Struct. Theochem*, 948, 61-64.

- Casassa, L. F., Harbertson, F. (2014). Extraction, Evolution, and Sensory Impact of Phenolic Compounds During Red Wine Maceration, *Annu. Rev. Food Sci. Technol*, 5, 83-109.
- Di Stefano, R., Cravero, M. C., Gentilini, N. (1989). Metodi per lo studio dei polifenoli de i vini, *L'Enotecnico*, 83-89.
- da Silva, R. J. M., Rigaud, J., Cheynier, V., Cheminat, A., Moutounet, M. (1991). Procyanidin dimers and trimers from grape seeds, *Phytochem*, 30, 1259-1264.
- Delin, C. R., Lee, T.L. (1992). Psychological contaminant of the moderate consumption of alcohol, *Wine Res*, 3, 5-23.
- Dittrich, H. H., Barth, A. (1992). Galactose und Arabinose in Mosten und Weinen der Auslese-Gruppe, *Wien Wiss*, 47, 129-131.
- Dupuy, P., Nortz, M., Puisais, J. (1995). Le vin et quelques causes de son enrichissement en fer, *Anal. Tec. Agric*, 4, 101-112
- Dixon, R. A., Xie, D. Y. (2005). Proanthocyanidins, a final frontier in flavonoid research, *New Phytolog*, 165, 9-28.
- De Freitas, V., Mateus, N. (2011). Formation of pyroanthocyanins in red wines: A new diverse class of anthocyanin derivatives, *Anal. Bioanal. Chem*, 401, 1463-1473.
- Divol, B., du Toit, M. & Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 95, 601–613 (2012).
- Димовска, В. Белески К., Бошков К. (2009). Влијание на климата врз фенолошкиот развој на виновата лоза и содржината на шеќер и вкупни киселини во ширата. Јубилеен годишен Зборник на Земјоделски институт, Том XXVI/XXVII, Скопје, РМакедонија.
- Edwards, C. G. (2006). Illustrated Guide to Microbes and Sediments in Wine, Beer, and Juice, *WineBugs LLC*, Pallman, WA.
- Fulcrand, H., Benabdeljalil, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Moutounet, M. (1998). A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acide and grape anthocyanins, *Phytochemistry*, 47, 1401-1407.
- Fleet, G. H (2003). Yeasts interaction and wine flavour, *Int. J. Food Microbiol*, 86, 11-22

- Glories, Y. (1984). The color of red wine. Part 2. Measurement, origin, and interpretation. *Connaiss Vigne Vin*, 18, 253-271
- Garcfa-Ruiz, J. M., Alcantra, R., Martin, J. (1991). Evaluation of wine stability to potassium hydrogen tartarate precipitation, *Am. J. Enol. Vitic*, 42, 336-340.
- Гулабоски, Р. (2019). Инструментални фармацевтски анализи, Учебник.
- Herbertson, J. F., Mireles, M., Harwood, E., Waller, K. M., Ross, C. F. (2009). Chemical and sensory effects of saignée water addition and extended maceration on high Brix must, *Am. J. Enol. Vitic*, 60, 60-450.
- Hopfer, H., Collins, T., Nelson, J. J. L., Heymann, H. (2015). The combined impact of vineyard and processing winery on the elemental profile of red wines, *Food Chem*, 172, 486-496.
- Ivanova, V., Stefova, M., Chinnici, F. (2010). Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods, *J. Serb. Chem. Soc*, 75, 45-59.
- Ivanova, V., Dörnyei, A., Márk, L., Vojnoski, B., Stefov, T., Stefova, M., Kilár, F. (2011). Polyphenolic content of Vranec wines produced by different vinification conditions, *Food Chem*, 124, 316-325.
- Ivanova, V., Vojnoski, B., Stefova, M. (2012). Effect of winemaking treatment and wine aging on phenolic content in Vranec wines, *J. Food Sci. Technol*, 49(2) 161-172.
- Иванова, В. (2013). Сензорна и аналитичка евалуација на вино, рецензирана скрипта, 30-33.
- Ivanova-Petropulos, V., Mitrev, S. (2014). Determination of SO<sub>2</sub> and reducing sugars in macedonian wines, *Yearbook of Faculty of Agriculture*, 12, 7-18.
- Иванова, В. (2014). Интерна скрипта по енологија. 1-15.
- Ivanova-Petropulos, V., Ricci, A., Nedelkovski, D., Dimovska, V., Parpinello, P. G., Versari, A. (2015). Targeted analysis of bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines, *Food Chem*, 171, 412-420.
- Johnson, H. (1989). The story of wine, *Vintage*, 23, 145-146.
- Kinssela, J. E., Frankel, E., German, J. B., Kanner, J. (1993). Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods, *Food Technol*. 47, 85-89.
- Kunkee, R. E., Bisson, L. F. (1993). Wine-making yeasts, *The Yeasts*, 5, 69-127



- Кавраковски, З. (1997). Основи на течна хроматографија под висок притисок.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L. (1997). Yeast killer systems, *Clin. Microbiol. Rev*, 10, 369-400.
- Monogas, M., Suarez, R., Gomez, Cordoves, C., Bartolome, B. (2005). Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS, *Am. J. Enol. Vitic*, 56, 139-147.
- Mukamal, K. J., Chiuve, S. E., Rimm, E. B. (2006). Alcohol consumption and risk for coronary heart disease in man with healthy lifestyles, *Arch. Intern. Med*, 166, 2145-2150.
- Mizuno, H., Hirano, K., Okamoto, G. (2006). Effect of anthocyanin composition in grape skin on anthocyanic vacuolar inclusion development and skin coloration, *Vitis*, 45, 77-173.
- Muñoz-Bernal, Ó. A., Verquez-Flores, A. A., de la Rosa, L. A., Rodrigo-García, J., Martínez-Ruiz, N. R., Alvarez-Parrilla, E. (2023). Enriched Red Wine: Phenolic Profile, Sensory Evaluation and in Vitro Bioaccessibility of Phenolic Compounds, *Foods*, 12, 1194.
- Mamolar-Domenech, S., Crespo-Sariol, H., Sáenz-Díez, J.C., Sánchez-Roca, A., Latorre-Biel, J-I, & Blanco, J. (2023). A new approach for monitoring the alcoholic fermentation process based on acoustic emission analysis: A preliminary assessment, *J. Food. Engine*, 111537.
- Nagel, C., Wulf, L. W. (1979). Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet Sauvignon, *Am. J. Enol. Vitic*, 30, 111-116.
- O.I.V. (2021). Recueil des methods internationales d'analyse des vins et des moûts, Anex A, O.I.V Paris.
- O.I.V. (2021). Recueil des methods internationales d'analyse des vins et des moûts, Anex C, O.I.V Paris.
- Plank, P. F. H., Zent, J. B. (1993). Use of enzymes in wine making and grape processing, *Beer and Wine Production-Analysis, Characterization, and Technological Advances*, 536, 181-196.

- Perez-Magarino, S., Revilla, I., Gonzales-Sanjose, M. I., Beltran, S. (1999). Various application of liquid chromatography-mass spectrometry to the analysis of phenolic compounds, *J. Chrom*, 847, 75-81.
- Pettigrew, S., Charters, S. (2006). Consumers, expectations of food and alcohol pairing, *Br. Food J*, 108, 169-180.
- Pantelić, M. M., Dabić Zagorac, D. Č., Davidović, S. M., Todić, S. R., Bešlić, Z. S., Gašić, U. M., Tešić, Ž. L. J., Natić, M. M. (2016). Identification of phenolic compounds in berry skin , pulp, and seeds in 13 grapevine grown in Serbia, *Food Chem*, 211, 243-252.
- Ribereau-Gayon, P. (1964). Les composés phénoliques du raisin et du vin, *Ann. Physiol*, 6, 119-147.
- Ribeiro-Correa., P. da Silva, J. M., Climaco, M. C. (1996). Influence of white wine filtration on flavor quality, *Am. J. Enol. Vitic*, 6, 80-83.
- Ribereau- Gayon, R., Doneche, B., Dubourdieu, D., Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology*, 1, 404.
- Regulation for the application of the oenological means and procedures, their characteristics, and the maximum approved amount of enological resources used in the production of wine, Official Gazette of the Republic of Macedonia, No 16, from 02.02.2012.
- Su, C. T., Singleton, V. L. (1969). Identification of three flavan-3-ols from grape, *Phytochemistry*, 8, 58-1553.
- Suomalainen, H., Oura, E. (1971). Yeast nutrition, *The Yeasts*, 2, 14-15.
- Somers, T. C. (1971). The polymeric nature of wine pigments, *Phytochemistry*, 10, 2175-2186.
- Seguin, G. (1986). Terroirs and pedology of wine growing, *Experientia*, 42, 861-873
- Singelton, V. L. (1987). Oxigen with phenols and related reactions in must, wines and model systems, observation and practical implications, *Am. J. Enol. Vitic*, 38, 69-77.
- Sponholz, W. R. (1988). Alcohols deerived from sugars and other sources and fullbodiedness of wine, *Wine Anal*, 47, 147-172.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins, *Phytochemistry*, 30, 3875-3883.

- Spayd, S. E., Andersen, J. (1996). Free amino acid composition of grape juice from 12 *Vitis vinifera* cultivars in Washington, *Am. J. Enol. Vitic*, 47, 389-402.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., Goldberg, D. M. (1997). Wine as a biological fluid: History, production and role in disease prevention, *Clin. Lab. Anal*, 11, 287-313.
- Spranger, I., Clímaco, M. C., Sun, B., Eiriz, N., Fortunato, C. (2004). Differentiation of red winemaking technologies by phenolic and volatile composition, *Anal. Chim. Acta*, 513, 61-151.
- Sun, B., Naves, A. C., Fernandes, T. A., Fernandes, A. L., Mateus, N., De Freitas, V., Leandro, C., Spranger, M. I. (2011). Evolution of phenolic composition of red wine during vinification and storage and its contribution to wine sensory properties and antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem*, 59, 6550-6557.
- Thoukis, G., Amerine, M. A. (1956). Fate of copper and Iron during fermentation of grape musts, *Am. J. Enol*, 7, 45-52.
- Troost, R. (1988). Tehnologie des Wines, *Handbuch der Lebensmitteltechnologie*, 2, 245.
- Tomijanovič, M. (2000). Instrumentalne kemijske metode, 2, 175-193.
- Vitrac, X., Castagnino, C., Waffo-Teguo, P., Delaunay, J. C., Vercauteren, J., Monti, J. P. (2001). Polyphenols newly extracted in red wine from southwestern France by centrifugal partition chromatography, *J. Agric. Food Chem*, 49, 5934-5938.
- Von Hellmuth, K. H., Fisher, E., Rapp, A. (1985). Uber das Verhalten von Spurenelementen und Radionukliden in Traubenmost bei der Garung und beim Weinausbau, *Dtsch. Labensm. Rundsch*, 81, 171-176.
- Vergara, C., Mardones, C., hermosín-Gutiérrez, I., Von Baer, D. (2010). Comparison of high-performance liquid chromatography separation of red wine anthocyanins on a mixed-mode ion-exchange reversed –phase and on a reversed-phase column, *J. Chromatogr*, 1217, 5710-5717.
- Vion, C., Muro, M., Bernard, M., Richard, B., Valentine, F., Yeramian, N., Masneuf-Pomarède, I., Tempère, S., & Marullo, P. (2023). New malic acid producer strains of *Saccharomyces cerevisiae* for preserving wine acidity during alcoholic fermentation, *Food Microbiol*, 112, 104209.
- Wilson, K. S., Walker, W. O., Rinelli, W. R. (1943). Liquid Sulphur Dioxide in the fruit industry, *J. Fruid. Prods*, 23, 72-82.

- Wulf, L., Nagel, C. W. (1978). High-pressure liquid-chromatographic separation of anthocyanins of *Vitis vinifera*, *Am. J. Enol. Vitic*, 29, 42-49.
- Weinbold, R. (1979). Gods, Man and Wine, *George Rainbird, London*.
- Wirdig, G., Woller, R. (1989). *Chemie des Wines*, *Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, Germany*.
- Wlaker, G .M. (1989). *Yeasts Physiology and Biotechnology*, *John Wiley & Sons, West Sussex, UK*.
- Watson, D. G. (2005). *Pharmaceutical analysis*, 2<sup>nd</sup> Edition, Elsevier.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, D. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., Prior, R. L. (2006). Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption, *J. Agric. Food Chem*, 54, 75-4069.