



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ – ВАРНА

ФАКУЛТЕТ „ФАРМАЦИЯ“

КАТЕДРА „ФИЗИКА И БИОФИЗИКА“

**Стефка Петрова Минкова**

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА ОПТИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ВИНА  
С ЦЕЛ РАЗРАБОТВАНЕ НА ЕКСПРЕСЕН МЕТОД ЗА ТЯХНОТО  
СРАВНИТЕЛНО ИДЕНТИФИЦИРАНЕ И ПРИЛОЖЕНИЕТО МУ  
В ПРАКТИКАТА**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор”  
в област на висшето образование 4. Природни науки, математика и  
информатика, 4.1 Физични науки и научна специалност:  
**„Медицинска физика”**

**Научни ръководители:** Проф. Кръстена Николова, д.ф.

Доц. Вера Хаджимитова, д.б.ф.

**Официални рецензенти:** Проф. Елена Стойкова, д.ф.н.

Проф. Венцислав Съинов, д.ф.н.

**Варна**

**2020 г.**

Настоящият дисертационен труд е разработен в катедра „Физика и биофизика“ при Факултет по фармация към Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Дисертационният труд съдържа 135 машинописни страници и е онагледен с 15 таблици и 77 фигури. Списъкът с цитираната литература включва 204 заглавия, от които 14 на кирилица и 190 на латиница.

**Председател:**

Проф. Кръстена Николова, д.ф.

**Външни членове:**

Проф. Елена Стойкова, д.ф.н.

Проф. Цветанка Бабева, д.ф.

Проф. Венцислав Съйнов, д.ф.н.

**Вътрешни членове:**

Доц. Стефан Кръстев, д.б.ф.

Проф. Кръстена Николова, д.ф.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Издавам огромна признателност на научните ми ръководители, проф. Кръстена Николова, д.ф., и доц. Вера Хаджимитова, д.б.ф., за това, че ме въведоха в тази научна тематика, за гласуваното доверие, неоченимата помощ, напътствията в процеса на работа, вярата в мен и предоставените ми възможности за изява.

Специални благодарности на инж. Тихомир Трифонов от „Винарска изба – Варна“ за предоставените ми от тях материали за изследване, както и за компетентната помощ и ценните съвети по технологичната част за производството на вина, необходими за разработване на дисертационния труд.

Благодаря на колегите от „Експериментална лаборатория по оптично охарактеризиране“ към ИОМТ–БАН, гр. София, за указаната помощ и съдействие.

Признателна съм на колегите от катедра „Физика и биофизика“ към Медицински университет – Варна за доброто отношение и благоприятната творческа среда.

Благодаря на моето семейство и приятели, които силно ме подкрепяха.

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на МУ-Варна и са на разположение в катедра „Физика и биофизика“ към Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

## СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

[A<sub>1</sub>]. – **Minkova S.**, Nikolova K., Eftimov T., Krustev S. Fluorescence and absorption spectroscopy - fast methods for determining the content of antioxidants and age of Bulgarian wines. Scripta Scientifica Pharmaceutica, 2017, p. 46-50.

[A<sub>2</sub>]. – Milev M., Nikolova Kr., Ivanova Ir., **Minkova St.**, Krustev St. Grouping of Bulgarian wines according to grape variety by using statistical methods. AIP Conference Proceedings. 2017:1910: 020003-020007, (SJР=0.17, Web of Science, Scopus).

[A<sub>3</sub>]. – **Минкова Ст.**, Христова-Авакумова Н., Николова Кр., Хаджимитова В., Какалова М., Кръстев Ст. Окачествяване на червени български вина чрез оптични характеристики и антиоксидантна активност. Сборник доклади, Национална научна конференция 15 години фармация в Медицински университет – Пловдив. 2018, Девин, с. 238-245.

[A<sub>4</sub>]. – **Minkova St.**, Vladev V., Hristova-Aqakumova N., Gabrova R., Kr. Nikolova, Eftimov T., Hadjimitova V. Comparative study of the characteristics of red Bulgarian and French wines using applied photonics methods. Proc. SPIE. 2019:11047:11047001 - 11047006, (SJР=0.24, Web of Science, Scopus).

## СЪДЪРЖАНИЕ

|   |           |
|---|-----------|
| ВЪВЕДЕНИЕ .....   | 5         |
| ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА .....  | 6         |
| Структура и обем на дисертацията.....   | 6         |
| <b>ГЛАВА 1. СРАВНИТЕЛНО ИЗСЛЕДВАНЕ И ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ХРАНИТЕЛНИ ПРОДУКТИ ЧРЕЗ СРЕДСТВАТА НА ПРИЛОЖНАТА ФОТОНИКА .....</b>                       | <b>8</b>  |
| <b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....</b>  | <b>11</b> |
| Други използвани методи за анализ на изследваните проби.....  | 14        |
| Определяне на общи антоциани .....  | 14        |
| Определяне на общи феноли.....  | 14        |
| Получаване на емисионно-излъчвателни матрици .....  | 14        |
| <b>ГЛАВА 3. ПРИЛОЖЕНИЕ НА МЕТОДИТЕ НА ФОТОНИКАТА ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ ОПТИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ВИНА ОТ РЕГИОНА НА ЮЖНА БЪЛГАРИЯ.....</b>                | <b>17</b> |
| <b>ГЛАВА 4. ПАРАМЕТРИ НА ПРИЛОЖНАТА ФОТОНИКА И АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ ЗА ЕКСПРЕСНО ОКАЧЕСТВЯВАНЕ НА ЧЕРВЕНИ ВИНА.....</b>                       | <b>21</b> |
| <b>ГЛАВА 5. ОЦЕНКА НА КИНЕТИЧНИ ПРОМЕНИ НА АНТИОКСИДАНТНАТА АКТИВНОСТ НА ВИНА ОТ ВАРНЕНСКИ РЕГИОН В РАЗЛИЧНИ СТАДИИ НА ТЯХНОТО РАЗВИТИЕ .....</b> | <b>28</b> |
| <b>ГЛАВА 6. СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ МЕЖДУ БЪЛГАРСКИ И ВНОСНИ ЧЕРВЕНИ ВИНА.....</b>   | <b>34</b> |
| ИЗВОДИ .....  | 39        |
| ПРИНОСИ.....  | 41        |
| СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....   | 42        |
| БЛАГОДАРНОСТИ .....   | 43        |

\*Номерацията на фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на тези в дисертационния труд.

## Използвани съкращения

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>ABTS</b>           | 2, 2-азино-бис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонова киселина) |
| <b>АОА</b>            | Антиоксидантна активност                                  |
| <b>АФК</b>            | Активна форма на кислород                                 |
| <b>CIELab</b>         | Колориметрична система                                    |
| <b>CL-SI</b>          | Хемилуминесцентен скевинджър индекс                       |
| <b>DRPH</b>           | 2, 2-дифенил-1-пикрилхидразил                             |
| <b>HAT</b>            | Водородно атомно преместване                              |
| <b>HDL холестерол</b> | Високоплътностен липопротеин                              |
| <b>PARAFAC</b>        | Паралелен многофакторен анализ                            |
| <b>PCA</b>            | Фактор анализ по метода на главните компоненти            |
| <b>SET</b>            | Единично електронно преместване                           |
| <b>TPC</b>            | Общото съдържание на феноли                               |

## ПРИНОСИ

Приносите на настоящия дисертационен труд могат да се определят като научно-приложни.

### Оригинални научно-приложни приноси:

➤ Проектирана, изработена и внедрена специална приставка към флуориметър **Brolight** за измерване на флуоресцентни спектри на силно поглъщащи проби в микроколичества без разреждане;

➤ За първи път е доказана приложимостта на фотониката за експресна качествена оценка на АОА на български червени вина;

➤ Създадена е уникална база данни от емисионно-излъчвателни матрици за две от най-предпочитаните български червени вина от сортове *Merlo* и *Каберне*, която може да бъде основа за разработка на количествено валидиран метод за определяне на фенолни съединения във вино от даден сорт чрез използване на математически техники като PARAFAC и PCA от по-висок порядък и биоинформационни методи.

➤ За първи път е изследван антиоксидантният скевинджър капацитет за български червени вина чрез хемилуминесценция и е показано, че всички проби от българско червено вино показват по-добра ефективност в елиминирането на хипохлорита в сравнение със супероксидния анион. Стойностите на CL-SI в супероксидната система варират между 42 и 84%, а в хипохлорита най-високата определена стойност на CL-SI е 38.2%.

### Научно-приложни приноси с потвърдителен характер

Установени са регресионни зависимости между:

- интензитета на излъчване  $I_{350-360/265}$  за възбуждаща светлинна вълна с дължина 265 nm и съдържанието на антоциани за български червени вина от сортове *Merlo* и *Каберне* с коефициент на корелация съответно 0.99 и 0.87;

- интензитета на цвета и оптичната плътност при 520 nm за български червени вина от сортове *Merlo* и *Каберне* с коефициент на корелация съответно 0.96 и 0.99;

- интензитета на излъчване  $I_{410-420/265}$  за възбуждаща светлинна вълна с дължина 265 nm и пълното полифенолно съдържание за червени вина от района на Париж.

Чрез предложената методика може качествено да се определи фенолното съдържание по интензитета на флуоресценция. По този параметър може да се направи качествена оценка на промяната на съдържанието на флуорофорите във виното през различните етапи на технологичната му обработка.

За валидиране на метода количествено трябва да се развие биоинформационна интерпретация на получените изображения за изследваните образци, като се има предвид, че виното представлява сложна система от комплексни данни. За да се интерпретира наборът от получените излъчвателни матрици, трябва да се използват високоспециализирани математически техники, като PARAFAC и PCA от по-висок порядък, както и да се пригоди PARAFAC анализът към универсален модел на вино от даден сорт.

## ВЪВЕДЕНИЕ

През 2002 г. Европейският парламент и Съветът на Европа приемат Регламент (ЕО) № 178/2002 (януари 2002) за определяне на общите принципи и изисквания на законодателството в областта на храните (Общ регламент за храните), като също така създават независима агенция, която отговаря за научните консултации и подкрепа – Европейския орган за безопасност на храните (EFSA). Основно внимание се отделя на здравословното хранене, свързано с консумация на продукти, обогатени с витамини, минерали, микроелементи и антиоксиданти, което понастоящем става част от нашата „култура на хранене“. Въвеждането на антиоксиданти към основната терапия на заболявания, които са свързани с оксидативен стрес и включването им в хранителен режим, подобряват значително устойчивостта на организма към вредни фактори на околната среда, допринасят за лечение на редица заболявания.

Безопасността на храните се контролира чрез въвеждането на система за контрол HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point). Понастоящем като стандарт са се наложили главно биологични, химични, органолептичните тестове (*human panel tests*), изследване на механичните свойства (*опън и натиск*) и химични аналитични тестове. Те обаче, в зависимост от спецификата си, могат да изискват твърде дълго време за осъществяване и получаване на резултатите, в много случаи могат да са напълно субективни, като зависят от състоянието на тестващите индивиди, а в болшинството случаи са много скъпи – изискват специализирана апаратура и консумативи. Интересът към методите на приложната фотоника в последните години се увеличава, тъй като тези методи са бързи, чувствителни, недеструктивни, без използване на химични реагенти и необходимост от специално обучени оператори. Приложната фотоника все повече се използва за разработване на сензорни системи за експресна оценка на времето на съхранение на храни и комплексна връзка между отделните показатели, характеризиращи качеството им.

Целта на дисертационния труд е определяне на оптични характеристики на вина с методите и средствата на приложната фотоника, изследване на антиоксидантните им свойства и установяване на корелации между тях и измерените оптични характеристики с цел разработване на експресен метод за идентифициране на образците и приложението на получените резултати за оценка влиянието на умерената консумация на виното върху човешкото здраве.

За реализирането на така формулираната цел са поставени следните задачи:

- ❖ получаване на емисионно-излъчвателни матрици на вина от различни райони с цел изследване на връзката между параметрите на приложната фотоника и състава на изследваните проби;
- ❖ получаване на бази данни с идентификационни профили на подбрани вина от различни региони на България, даващи възможност за идентифицирането им по сорт и регион;
- ❖ определяне на антиоксидантната активност (АОА) на подбрани сортове червени вина и оценка на антиоксидантния скевинджър капацитет на някои от образците в системи, съдържащи активни форми на кислород (АФК);
- ❖ проследяване кинетиката на АОА, количеството на антоциани, пълното фенолно съдържание и оптичните характеристики на червени вина от Варненски регион в процеса на тяхното производство.

### Структура и обем на дисертацията

Настоящият дисертационен труд е оформен в шест глави.

**В Глава 1. Сравнително изследване и идентифициране на хранителни продукти чрез средствата на приложната фотоника**, накратко са представени основните приложения на фотониката за анализ на храни и напитки, известни в литературата. Представен е здравословният ефект на умерената консумация на червени вина в моделни системи и компоненти с биологичен потенциал, в системи с клетки, експерименти с опитни животни, както и влиянието им върху пациенти.

**В Глава 2. Материали и методи**, са описани използваните материали и методи за изследване на български вина от подбрани сортове грозде. Специално внимание е отделено на оптични методи, като влакнесто-оптична флуоресцентна спектроскопия, спектрофотометрия във видимия диапазон за определяне АОА чрез използване на DPPH и ABTS радикали и колориметрия. За обработка на

Можем да направим следните изводи:

Доказано е, че за разработването на метод за качествена оценка на антиоксидантните свойства и търсените от потребителя качества на образците е необходимо комплексно използване на средствата на приложната фотоника (емисионно-излъчвателни матрици) и видима спектроскопия. По наличието на емисионни флуоресцентни пикове при дадени дължини на вълната и по интензитета им може да се съди за присъствието на основни флуорофори, като танини, антоциани, фенолни съединения и др., определящи антиоксидантния ефект. Флуоресцентните спектри дават информация за надеждна идентификация на виното според сорта грозде, регион на отглеждане, получени за набор от дължини на вълните на възбуждащата светлина, както и създаването на библиотека от „finger prints“.

В направеното проучване е доказано, че при изследване на винени образци от един и същи сорт е възможно количествено определяне на антоцианите по емисионния интензитет на флуоресценция  $I_{350-360/265}$  или по светлостта  $L$  на пробата. Този резултат може да послужи за основа на разработка на методика, която да се използва във винарските изби за експресен анализ (намаляването на съдържанието на антоцианите води до загуба на цвят и интензитет на флуоресценция).

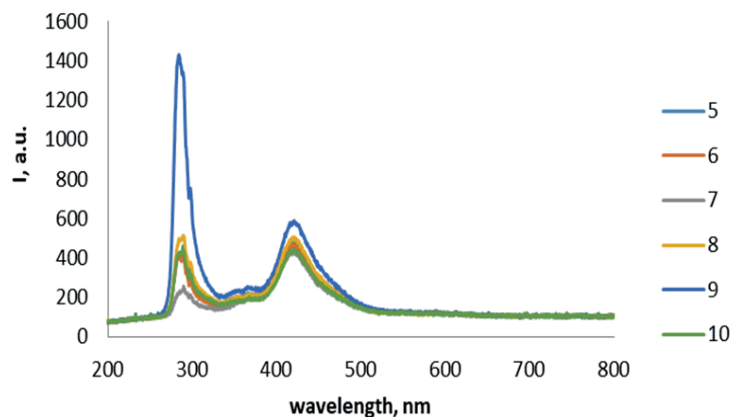
При проследяване на кинетичните промени на червеното вино в хода на неговата преработка можем да направим следните изводи:

- Във всички етапи на преработката на червените вина антирадикаловата активност е по-слаба в сравнение с редуccionната им способност. АОА слабо нараства при отделните етапи на обработка.

- Червено вино от сорт *Пино Ноар* притежава по-висок тролокс еквивалент (33.99 mmol TE) и следователно по-добра редуccionна способност по ABTS метода от всички изследвани червени вина в глава 4 от районите на Дунавската равнина (8.62 mmol TE), както и от пробите от сорт *Мерло* от района на Чили (27.66 mmol TE) и Южна Африка (14.89 mmol TE) и от пробите френски вина от района на Париж от сорт *Сира* (18.09).

- По време на съхранение в дъбови бъчви червено вино сорт *Каберне Фран* съдържа по-голямо количество антоцианини в сравнение със същото вино от Харманли.

- Червеното вино от сорт *Пино Ноар* съдържа 12 пъти повече антоцианини в сравнение със сорт *Каберне Фран* от област Стара Загора. Изследваните проби от сорт *Пино Ноар* притежават общо съдържание на полифеноли от около 213 mg/l.



Забележка: Номерата в легендите на фигура 27 съвпадат с номерата на образците от таблица 3

**Фиг. 27. Флуоресцентни спектри при дължина на вълната на възбуждащата светлина 265 nm за френски вина от района на Париж**

Направените сравнения между български и вносни червени вина от един и същи ценови клас дава възможност за следните изводи:

- ❖ съставът и свойствата на червеното вино силно зависят от характера на климата през годината на реколта, а също така и от биологичните особености на сорта грозде. Качествената връзка между тези параметри може да бъде доказана със средствата на приложната фотоника;
- ❖ цветът на виното се определя от съдържанието на пигментни вещества като антоциани, чието съдържание зависи не толкова от сорта грозде, колкото от региона на неговото отглеждане, годината на реколта и технологията на производство – етанолно съдържание и тип на използвания бистрител;
- ❖ всички червени вина са с по-висока АОА относно АВТС радикали в сравнение с DPPH радикали;
- ❖ между физикохимичните параметри и тези на приложната фотоника съществува ясна връзка – френските образци показват линейна зависимост между АОА и интензитета на флуоресценция, свързан с фенолните съединения, а при българските вина е ясно изразена зависимостта между спектъра на флуоресценция и съдържанието на антоциани.

резултатите са приложени математико-статистически методи като клъстер-анализ, фактор-анализ и дискриминантен анализ, а за обработване на данни и получаване на емисионно-излъчвателни матрици на изследваните образци е използван софтуерен продукт MATLABM 7.0.

**В Глава 3. Приложение на методите на фотониката за определяне оптични характеристики на вина от региона на Южна България,** са представени получените емисионно-излъчвателни матрици на български бели и червени вина от различни региони и са установени корелации между интензитета на флуоресцентните максимуми и компонентите на пробите, имащи важно значение за качеството им с оглед на здравословното хранене. Доказано е, че чрез получаване на емисионно-излъчвателни матрици (fingerprints) могат да се различат винени образци от даден сорт, но от различен регион, сортово вино от купажно такова, както и качествено да се определи наличието на дадени фенолни съединения.

**В Глава 4. Параметри на приложната фотоника и антиоксидантна активност за експресно окачествяване на червени вина,** са представени резултатите от проведените изследвания на АОА на вина от сортове *Мерло, Каберне Совиньон, Сира, Малбек, Памид и Каберне Фран* от различни райони на България чрез АВТС и DPPH методи. Доказано е, че голяма част от вината показват по-висока АОА в тестваната моделна система с АВТС радикали.

**В Глава 5. Оценка на кинетични промени на антиоксидантната активност на вина от Варненски регион в различни стадии на тяхното развитие,** са проследени кинетичните промени на АОА, антоциани, пълно фенолно съдържание и оптичните характеристики на вина от Варненски регион от сортове *Пино Ноар и Санджовезе*. Направено е сравнение на АОА на две изследвани червени вина с тази на вина от същия сорт от други райони на Северна България, Южна България и чужбина.

**В Глава 6. Сравнителен анализ между български и вносни червени вина,** е направен сравнителен анализ между български и вносни червени вина. Установено е, че АОА на френски вина от сортове грозде *Каберне Совиньон и Сира* от районите на Ница и Париж е сравнима с тази на български червени вина от същия сорт от районите на Тракийската низина и Харманли. Интересен е фактът, че купажните български червени вина притежават по-висока АОА от френските образци.



## ГЛАВА 1. СРАВНИТЕЛНО ИЗСЛЕДВАНЕ И ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ХРАНИТЕЛНИ ПРОДУКТИ ЧРЕЗ СРЕДСТВАТА НА ПРИЛОЖНАТА ФОТОНИКА

В Глава 1 е направен литературен обзор на приложението на спектрофотометрията за изследване и идентифициране на хранителни продукти чрез средства на приложната фотоника.

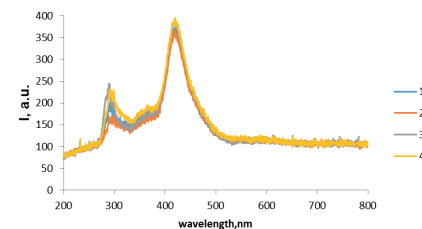
Приложната фотоника се използва за качествено откриване на вещества – луминофори, в частност маслиново масло, масло от чия, пъпеш, тиква, масло от бял трън, ленено и маково семе. Чрез изследване на флуоресцентни спектри на ябълков сок могат да бъдат установени пет вида флуорофори с различни профили и относителни разпределения. Чрез тримерната (3D) фронтална флуоресцентна спектроскопия са направени изследвания за некоректна замяна на портокалов сок със сок от грейпфрут, като се проучва съдържанието на свободните радикали и общото съдържание на флаваноици.

Флуоресцентната спектроскопия се използва за откриване на фалшифициране на бренди с винен спиртен дестилат, за оценка на качеството на бренди, за откриване на добавен спирт или изкуствено придобит цвят чрез добавка на карамел. Чрез флуоресцентна спектроскопия се определя съдържанието на фенолни киселини в бели вина. За целта се изследва произходът на получените допълнителни флуоресцентни пикове, наблюдавани при белите вина с дължина на вълната на възбуждане при 325 nm в сравнение с тези, получени с дължина на вълната на възбуждане при 532 nm. 3D челната флуоресцентна спектроскопия е успешен метод за различаване на различните типови вина от сортове грозде. Тези методи се използват за различаване на френски от немски вина при дължини на вълните на възбуждане в интервала 250–350 nm. В литературата са описани изследвания, направени с различни видове вина от района на Италия, използвайки дължини на вълната на възбуждане в диапазона 245-345 nm. Методът може да определи степента на процеса на стареене на два вида вина *Rioja* (вина от Италия) и друг вид италианско вино, като се сравняват вина „резерва“ с млади вина. Правени са анализи на вина, принадлежащи към три различни сорта грозде (*Сира*, *Каберне Совиньон* и *Пино Ноар*) от една и съща географска област, като се анализират стойностите на рН-то в различен диапазон. Изследванията показват, че флуоресцентните спектри от винени проби с нормално рН невинаги са достатъчни за разделянето на отделните видове вина. Структурните промени на полифенолите, получени от промяната в рН, индуцират значителни разлики в техните флуоресцентни спектри, което дава възможност за по-ясно разделяне на различните видове винени проби.

свързани с процеса на развитие на физиологичната зрелост на гроздето поради дадени особености в климата, както и с влиянието на концентрацията на етанола върху екстрахируемостта на тези съединения.

Червеното вино от един и същи сорт грозде, но отглеждано в различни райони на България, има различна светлост  $L$ . Най-голяма е тя за проби от района на Дунавската равнина и най-малка е за образци от районите на Харманли и Свиленград. Най-близки по светлост са пробите от грозде сорт *Мерло* от Чили с тези от същия сорт грозде, отглеждано в Тракийската низина в България, както и френско вино от сорт *Мерло* с вино от същия сорт грозде, отглеждано в Дунавската равнина. Пробите от сорт *Каберне Совиньон* от Франция имат близка светлост с наши вина от същия сорт грозде, отглеждано в Тракийската низина. Следователно върху светлостта на виното оказват по-съществено влияние климатичните условия на региона и технологията на обработка, отколкото сортът грозде.

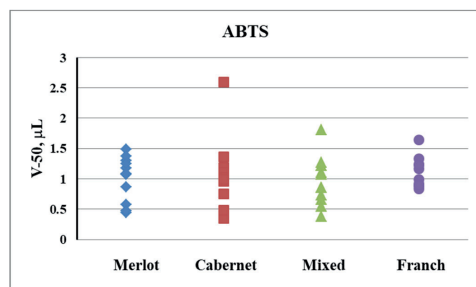
При облъчване на пробите със светлина с дължина на вълната на възбуждане при 265 nm наблюдаваме максимум на излъчване за дължината на вълната в диапазон 410–420 nm, което е свързано с наличието на полифенолни съединения с АОА. Наблюдаваният при българските образци максимум в интервала на дължина на вълната на излъчване 350–360 nm е свързан със съдържание на антоциани. Изследваните винени образци от региона на Париж имат и друг пик при 290 nm, който е свързан със съдържание на епикатехини (фигури 26 и 27). Корелационна зависимост между интензитета на флуоресценцията и антоцианите не се наблюдава. Установена е линейна регресионна зависимост между общото съдържание на полифеноли и флуоресцентния максимум в интервала на дължината на вълната 410–420 nm за образците от района на Париж.



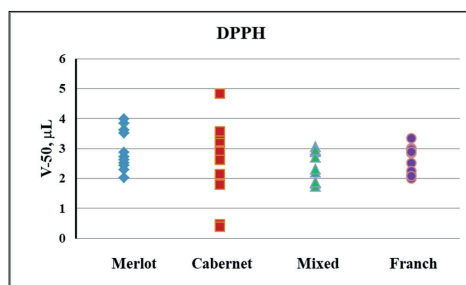
Забележка: Номерата в легендите на фигура 26 съвпадат с номерата на образците от таблица 3

**Фиг. 26. Флуоресцентни спектри при дължина на вълната на възбуждащата светлина 265 nm за френски вина от района на Ница**





Фиг. 24. Сравнителна фигура за V-50 за тестваните вина в ABTS система



Фиг. 25. Сравнителна фигура за V-50 за тестваните вина в DPPH система

В повечето случаи френските вина притежават по-високо съдържание на антоциани в сравнение с българските. Трябва да се отбележи, че червено вино от района на Харманли от сорт *Каберне Совиньон* (166,45 mg/l) има приблизително около 2 пъти по-високо съдържание на антоциани в сравнение с френските вина от същия сорт (74,96 mg/l). Ниско съдържание на антоцианите без тенденция на зависимост от реколтата за червени вина от посочения сорт грозде има в периода 2001–2004 г. Най-близко съдържание на антоциани има червено вино от сорт *Мерло* от района на Асеновград (42,54 mg/l) спрямо френско вино от същия сорт, при което съдържанието на антоциани е 36,47 mg/l. Вино от сорт *Малбек* от района на Харманли има съдържание на антоциани 134,75 mg/l спрямо френско вино от същия сорт от района на Ница съдържащо 123,19 mg/l антоциани.

Най-високо съдържание на антоциани се установява, че притежават червените вина от района на Харманли. Наблюдаваните ефекти могат да бъдат

В таблица 1 са представени данни за дължината на вълната на възбуждащата светлина и дължината на вълната на емисия за флуорофори във вина, винени напитки и сокове според литературни данни.

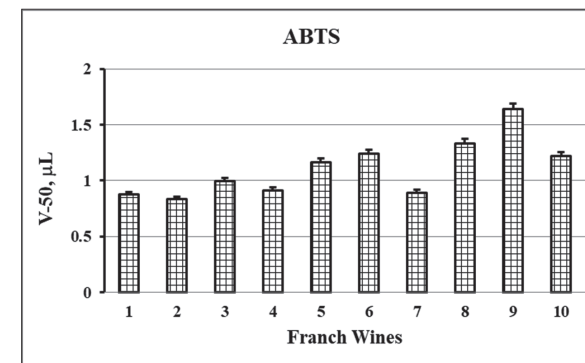
Таблица 1. Основни флуорофори в плодови напитки

| Флуорофор       | Дължина на вълната на възбуждане [nm] | Дължина на вълната на излъчване [nm] | Според литературни данни                  |
|-----------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---|
| Gallic acid     | 250-280                               | 382                                  | Lakowicz R., 2006, Silvana M. et al, 2015 |
| Vanillic acid   | 250-280                               | 349, 366                             | Lakowicz R., 2006, Silvana M. et al, 2015 |
| Syringic acid   | 250-280                               | 361                                  | Lakowicz R., 2006, Silvana M. et al, 2015 |
| Ferulic acid    | 335                                   | 418                                  | Lakowicz R., 2006, Silvana M. et al, 2015 |
| P-coumaric acid | 260; 353                              | 426, 422                             | Lakowicz R., 2006, Silvana M. et al, 2015 |
| Caffeic acid    | 262, 336                              | 426, 457                             | Lakowicz R., 2006, Silvana M. et al, 2015 |
| Umbelliferone   | 340-365                               | 425                                  | Lakowicz R., 2006, Silvana M. et al, 2015 |
| Scopoletin      | 340-365                               | 425                                  | Lakowicz R., 2006, Silvana M. et al, 2015 |
| Caramel         | 340-380                               | 390-420                              | Lakowicz R., 2006, Silvana M. et al, 2015 |
| Tryptophan      | 280                                   | 356                                  | Lakowicz R., 2006, Su A. K et al, 2004    |
| Riboflavin      | 270                                   | 518                                  | Lakowicz R., 2006, Su A. K et al, 2004    |
| Kampherol       | 298                                   | 400                                  | Lakowicz R., 2006, Silvana M. et al, 2015 |
| Tyrosine        | 275                                   | 302                                  | Lakowicz R., 2006, Silvana M. et al, 2015 |
| Myrecitin       | 268                                   | 400                                  | Lakowicz R., 2006, Silvana M. et al, 2015 |
| Quercitrin      | 268                                   | 370                                  | Lakowicz R., 2006, Silvana M. et al, 2015 |
| Katechin        | 278                                   | 360                                  | Lakowicz R., 2006, Silvana M. et al, 2015 |

Проведени са редица експерименти върху опитни животни за цялостно проучване на ефектите на виното върху човешкото здраве. Ефектът при употребата на червено вино върху нивата на общия холестерол, както и на компонентите на липидния профил, са изследвани в системи *in vivo* върху биологични модели. В експериментите са използвани вино и винен екстракт, несъдържащ алкохол, редовно и в умерени дози с цел да се оцени отделно ефектът на винените компоненти. Резултатът от експериментите е свързан с намаляване на общия холестерол и триглицеридите, като се установява че нивата на HDL холестерола не се променят. Червеното вино при умерена консумация е една от най-полезните алкохолни напитки, аргументите за което се базират на множество проучвания.

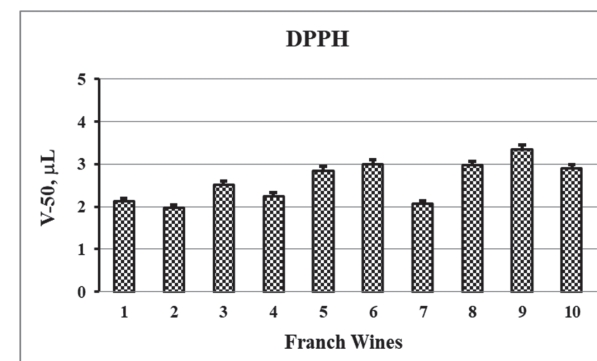
В литературата е установено, че употребата на ресвератрол намалява риска, свързан с голям брой сърдечно-съдови заболявания: хипертрофия, сърдечно-артериална болест и атеросклероза в групата от пациенти, приемали умерени количества червено вино. Установено е още, че менталното здраве на консумиращите вино е по-добро в сравнение с участниците в групата неупотребявали вино.

Направен е експеримент с 39 здрави доброволци на възраст между 18 и 40 години, разделени в 2 групи – приемащи червено вино по 0.2 l на ден и приемащи вода в продължение на 3 седмици. В края на периода за участниците в групата, приемащи вино в това умерено количество, е установено подобряване на хемореологичните характеристики на кръвта им, което се изразява в намаляване на степента на агрегация на еритроцитите и увеличаване на деформируемостта им при хлъзгане, спрямо контролната група, приемащи само вода. Установеното подобряване на хемореологичните показатели на кръвния ток води до подобряване на състоянието при коронарна болест на сърцето. От социална гледна точка, изследването на влиянието на употребата на вино върху липидния статус на индивиди с наднормено тегло има важно значение. При такива пациенти е проведено проучване, в резултатите от което е доказано, че очаквано високите нива на маркерите на оксидативен стрес, нивата на общия холестерол и триглицеридите намаляват при умерена употреба на вино.



Забележка: Номерата от 1 до 10 съответстват на образци от 1 до 10 в таблица 3

**Фиг. 22. Антиоксидантна активност на френски вина, получена чрез ABTS метод чрез стойностите на V-50**



Забележка: Номерата от 1 до 10 съответстват на образци от 1 до 10 в таблица 3

**Фиг. 23. Антиоксидантна активност на френски вина, получена чрез DPPH метод чрез стойностите на V-50**

При сравняване на френските с българските вина, антиоксидантният потенциал на френските вина е сходен с този на българските в съответната тестова система. Интересен е фактът, че купажните български червени вина притежават по-висока AOA от изследваните френски образци (фигури 24 и 25).

## ГЛАВА 6. СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ МЕЖДУ БЪЛГАРСКИ И ВНОСНИ ЧЕРВЕНИ ВИНА

Целта на настоящето изследване, изложено в тази глава, е свързана със сравнителен анализ на физикохимични характеристики на винени образци от България и Франция, използвайки средствата на приложната фотоника, както и да се получат пръстовите им отпечатащи с оглед определяне влиянието на региона върху АОА и фенолното съдържание на пробите.

За постигане на целта е необходимо:

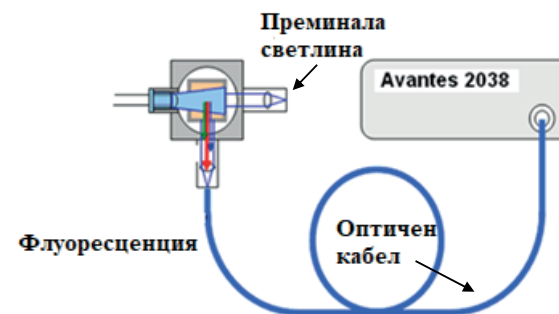
- ❖ подбиране на френски вина от същия ценови клас или сходни на изследваните български сортове грозде;
- ❖ изследване на АОА на френските образци по АВТС и DPPH методи и сравняването ѝ с тази на български образци;
- ❖ провеждане на сравнителен анализ между цветовете параметри, съдържанието на антоциани и полифеноли на български и френски вина;
- ❖ откриване на корелации между АОА и параметрите на приложната фотоника с цел експресно окачествяване на образците.

При френските вина доминират компонентите, които проявяват антиоксидантните си свойства, установени чрез SET механизъм, над компонентите, реализиращи ефекта си чрез НАТ механизъм. Същата тенденция е наблюдавана и за български вина от сортове *Мерло* и *Каберне Совиньон*. Най-висока АОА от френските вина и по двата метода имат проби 2 и 7 (таблица 2). АОА на проба 2, получена от червено грозде сорт *Малбек* от района на Ница, е  $V_{50} = 0.833 \mu\text{l}$ . По своята АОА тя е най-близо до проби купажни вина 24 ( $V_{50} = 0.851 \mu\text{l}$ ) и 27 ( $V_{50} = 0.85 \mu\text{l}$ ), произведени в района на Харманли и Сакар планина (таблица 2). Българското червено вино от сорт грозде *Малбек* е със значително по-висока АОА ( $V_{50} = 0.543 \mu\text{l}$ ). АОА на френски вина от сортове грозде *Каберне Совиньон* и *Сира* от районите на Ница и Париж е сравнима с тази на български червени вина от същия сорт от районите на Тракийската низина и Харманли съответно. Данни за антиоксидантния потенциал са показани на фигури 22 и 23).

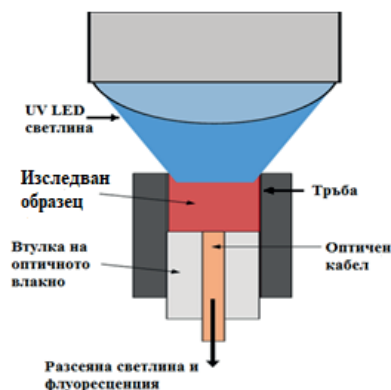
## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

В тази глава са описани използваните в дисертацията материали и методи за определяне на оптичните характеристики, АОА на изследваните проби вина от различни региони на България, както и използваните статистическите методи за обработка на получените резултати от проведените експерименти.

За целите на дисертационния труд флуоресцентните спектрални характеристики на винените образци (Глава 3) са измерени с оптичен спектрометър (AvaSpec-2048, Avantes) с работен диапазон от 200 до 1100 nm. Източниците, използвани за измерване на флуоресцентните спектри, са светодиоди (LED), работещи при дължини на вълните 245 nm, 265 nm, 275 nm и 295 nm. Разделителната способност на спектрометъра е 8 nm за входен процеп от 200  $\mu\text{m}$ . В представеното изследване, за да се измерят флуоресцентните спектри на вина (особено тъмните червени вина) без разреждане, държателят на кюветата се модифицира по следния начин: първата сонда (оптично влакно) е поставена директно в изследваната пробата, а втората сонда е фиксирана върху горната повърхност на капката. Схемата на спектрометъра и експерименталната установка за изследване на пробата са показани на фигури 1 и 2.

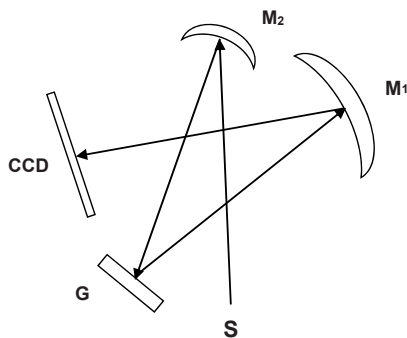


Фиг. 1. Принципна схема на експериментална установка за получаване на флуоресцентни спектри



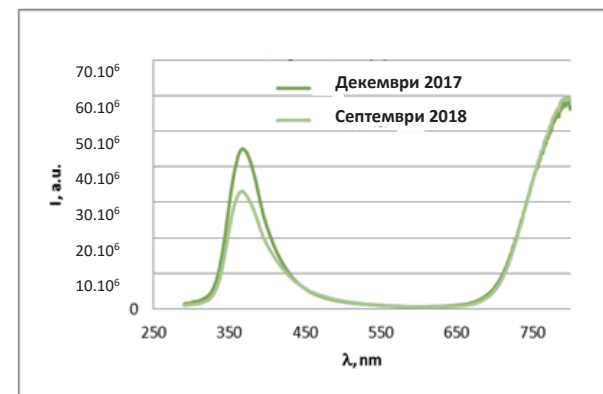
Фиг. 2. Принципна експериментална схема за флуоресцентно изследване на образци

За провеждане на изследванията, представени в Глави 4, 5 и 6, е използван спектрофотометър Brolight, използващ оптичната схема на Czerny-Turner. Структурата на системата е проста и компактна, както е показано на фигура 3.



Фиг. 3. Принципна схема на спектрофотометър Brolight

За получаване на флуоресцентни спектри в Глави 4 и 5 е използвана стандартната методика: пробата се налива в кварцова кювета с дебелина 10 mm, като виненият образец се разрежда 1:100, а в Глава 6 е описана специално конструирана приставка към спектрофотометъра, позволяваща измерване на силно поглъщащи проби червени вина без разреждане като се избира оптимална дебелина на изследвания слой вино за конкретен сорт грозде (фигура 4).

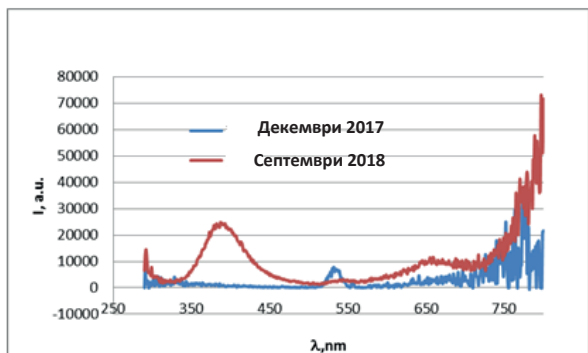


Фиг. 21 б) Флуоресцентни спектри за проби розе от сорт Санджовезе при възбуждаща дължина на вълната 265 nm

При възбуждаща светлина с дължина на вълната 300 nm двата вида вина показват максимум на излъчване около 365 nm, свързани със съдържанието на фотокатехини. Характерните флуоресцентни пикове на ресвератрол около 390 nm за възбуждаща дължина на вълната от 300 nm в първия етап на кинетичните промени се наблюдават за вина сорт *Каберне Фран*.

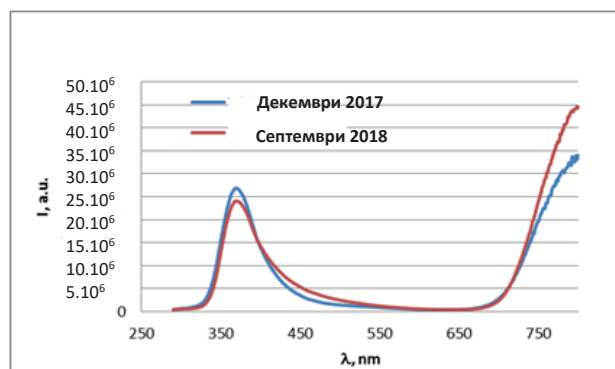
От получените резултати в тази глава може да се направи изводът, че за всички проби вина антиоксидантният потенциал в моделната система с радикал ABTS е по-висок в сравнение с този с DPPH. По време на съхранението се наблюдава намаляване на съдържанието на полифеноли. Установена е корелация между пика на флуоресценция и съдържанието на антоциани за дължината на вълната на възбуждане, което не се наблюдава по отношение на съдържанието на полифеноли.

Също така може да се направи изводът, че Североизточният Черноморски регион може да бъде производител на качествено червено вино, използвайки подходяща технология и подбор на сортове грозде.

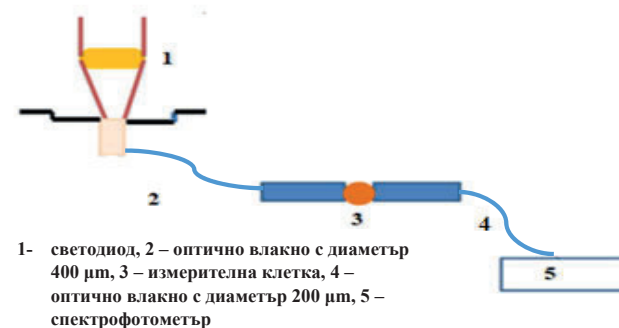


Фиг. 20. Флуоресцентни спектри за проба червено вино от сорт Пино Ноар, при възбуждаща светлина с дължина на вълната 265 nm

На фигури 21 а) и б) са представени спектрите на флуоресценция за двата типа вино розе при дължина на вълната на възбуждане при 265 nm. Наблюдаваният при червените вина пик за дължината на вълната на възбуждане с 265 nm в интервала 340-385 nm, свързан с наличието на антоцианите, се наблюдава и тук. Ясно се вижда, че интензитетът, изразен в относителни единици, намалява с намаляването на съдържанието на антоцианите по време на двата етапа на изследване при технологичната обработка на пробите от тип *розе*.



Фиг. 21 а) Флуоресцентни спектри за проби розе от сорт Пино Ноар при възбуждаща светлина с дължина на вълната 265 nm



Фиг. 4. Принципна схема на приставка за измерване на силно поглъщащи проби

#### Определяне на антиоксидантна активност

АОА на винените образци, изследвани в Глави 4, 5 и 6, е определена по два метода – *ABTS* и *DPPH*. Двата метода са взаимно допълващи се и оценяващи различни аспекти на редукционната активност на пробите:

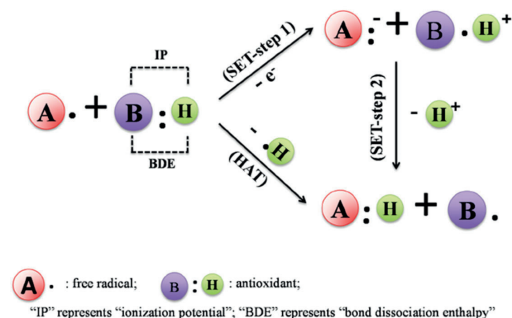
❖ **DPPH** е метод, който се използва за оценяване на количеството на антиоксиданти, които реализират своята активност, чрез водород-донорни свойства (HAT – hydrogen atom transfer);

❖ **ABTS** е метод, чрез който се оценяват компоненти, проявяващи своята активност чрез електрон-донорни свойства (SET – single electron transfer).

АОА на образците е определена, използвайки формулата:

$$AOA = \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \quad (1)$$

Счита се, че *ABTS* тестовата система позволява да се установят антиоксидантите, които проявяват своя антиоксидантен потенциал чрез SET (single electron transfer) механизъм, а *DPPH* методът – чрез HAT (hydrogen atom transfer) механизъм. Антиоксидантите могат да проявяват своя антиоксидантен потенциал чрез единия, чрез другия или и по двата механизма. На фигура 5 са илюстрирани тези механизми.



Фиг. 5. Механизми, чрез които се реализира SET и HAT активност

### Други използвани методи за анализ на изследваните проби

#### Определяне на общи антоциани

Образците се центрофугират. След това 20  $\mu\text{l}$  от 20% ацеталдехид се добавя към 2 ml вино и образецът се оставя да престои 45 min. Измерва се оптичната плътност на така получения образец при 520 nm в кювета с дебелина 1 mm. Определя се също така оптичната плътност при дължина на вълната 520 nm на винения образец без добавяне на ацеталдехид. По специални зависимости се определя общото съдържание на антоциани и копигментните антоциани. В дисертационния труд откритите зависимости са свързани с общото съдържание на антоциани.

#### Определяне на общи феноли

Общото съдържание на феноли (TPC) се измерва, като се използва методът на Folin-Ciocalteu.

Математическата обработка на данните е извършена чрез клъстер-анализ и фактор-анализ по метода на главните компоненти (PCA – Principal component analysis). Проведен е и дискриминантен анализ на изследваните групи вина.

#### Получаване на емисионно-излъчвателни матрици

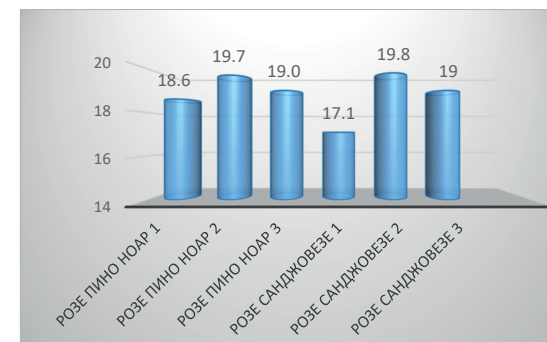
MATLAB 7.0 софтуер е използван за обработка на експериментални резултати и получаване на тримерните емисионно-излъчвателни матрици, както и за първите и вторите производни на флуоресцентните спектри. Подробна информация за типа вино и региона на добиване е дадена в таблица 2.

С цел сравняване на параметрите, определящи качеството на български червени вина, е направена съпоставка с показателите на вносни червени вина от сходен сорт и същия ценови клас (таблица 3).

Проследена е промяната на общото съдържание на полифеноли и антоциани при различните етапи на технологична обработка на две червени вина и две розета. Резултатите са представени на фигури 19 а) и 19 б).



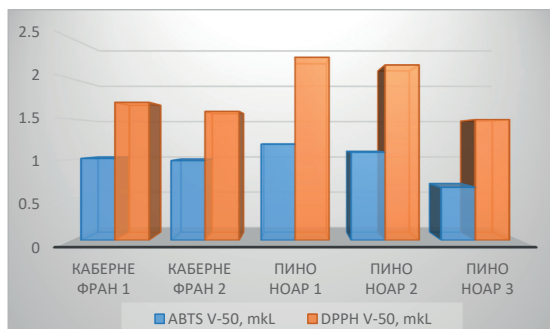
Фиг.19 а) Промяна на съдържанието на общите фенолни съединения в червени вина и розе сорт Пино Ноар и Каберне Фран по време на технологичната им обработка



Фиг. 19 б) Промяна на съдържанието на общите фенолни съединения в червени вина и розе сорт Пино Ноар и Санджовеце по време на технологичната им обработка

Получени са флуоресцентни спектри за проби от червени вина на две марки вина (сортове Каберне Фран и Пино Ноар) при дължини на вълните на възбуждане 265 nm и 300 nm. При дължина на вълната на възбуждане 265 nm се наблюдава интензивен пик на излъчване при 340 nm и 385 nm за двете марки червени вина. Според данни от литературата този пик е свързан със съдържанието на антоцианини (Rodriguez-Delgado M. A. at all, 2001) (фигура 20).

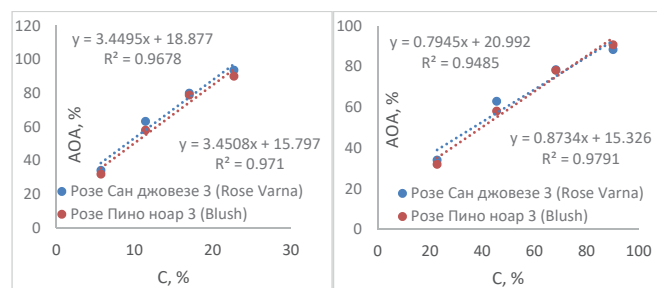




1 - декември 2017 г., 2 – февруари 2018 г., 3 – септември 2018 г.

**Фиг. 17. Промяна на обема V-50 при различни етапи на обработка на червено вино от района на Варна**

На фигура 18 е показана концентрационната зависимост между количеството на винен продукт и АОА за розови вина от два различни сорта Санджовезе и Пино Ноар след бутилиране (септември 2018 г.).



В системи с ABTS радикали      В системи с DPPH радикали

**Фиг. 18. Зависимост на АОА и количеството винен продукт за вина тип розе от сортовете Санджовезе и Пино Ноар**

Антиоксидантните активности на вината, оценени по отделните методи, са близки, като розе от сорт Санджовезе винаги има малко по-висока АОА. При розе от сорт Санджовезе отношението на обемите V-50 по DPPH и ABTS в двата етапа от производството е около 1.25–1.27.

**Таблица 2. Детайлна информация за червени вина, анализирани в Глава 4**

| №  | Регион             | Сорт грозде      | Година | №  | Регион            | Сорт Грозде                          | Година |
|----|--------------------|------------------|--------|----|-------------------|--------------------------------------|--------|
| 1  | Харманли           | Мерло            | 2012   | 17 | Монтана           | Каберне Совиньон                     | 2013   |
| 2  | Харманли           | Мерло            | 2013   | 18 | Тракийска равнина | Каберне Совиньон                     | 2013   |
| 3  | Харманли           | Мерло            | 2014   | 19 | Тракийска равнина | Каберне Совиньон                     | 2013   |
| 4  | Харманли           | Мерло            | 2015   | 20 | Харманли          | Каберне Совиньон                     | 2016   |
| 5  | Харманли           | Мерло            | 2016   | 21 | Стара Загора      | Каберне Совиньон                     | 2013   |
| 6  | Плевен             | Мерло            | 2013   | 22 | Монтана           | Каберне Совиньон и Мерло             | 2013   |
| 7  | Тракийска равнина  | Мерло            | 2013   | 23 | Видин             | Каберне Совиньон и Сира              | 2013   |
| 8  | Ямбол              | Мерло            | 2013   | 24 | Сакар планина     | Каберне Совиньон и Сира              | 2013   |
| 9  | Асеновград         | Мерло            | 2013   | 25 | Сакар планина     | Каберне Совиньон Сира и Мерло.       | 2013   |
| 10 | Стара Загора       | Мерло            | 2013   | 26 | Стара Загора      | Каберне Франк                        | 2013   |
| 11 | Велики Преслав     | Мерло            | 2013   | 27 | Харманли          | Каберне Совиньо, Сира, Памид и Мерло | 2016   |
| 12 | Дунавската равнина | Мерло            | 2013   | 28 | Свиленград        | Мерло и Малбек                       | 2014   |
| 13 | Харманли           | Каберне Совиньон | 2013   | 29 | Тракийска равнина | Мерло и Малер                        | 2014   |
| 14 | Сухиндол           | Каберне Совиньон | 2014   | 30 | Харманли          | Сира                                 | 2016   |
| 15 | Стара Загора       | Каберне Совиньон | 2016   | 31 | Харманли          | Малбек                               | 2016   |
| 16 | Тракийска равнина  | Каберне Совиньон | 2014   | 32 | Тракийска равнина | Божоле                               | 2015   |

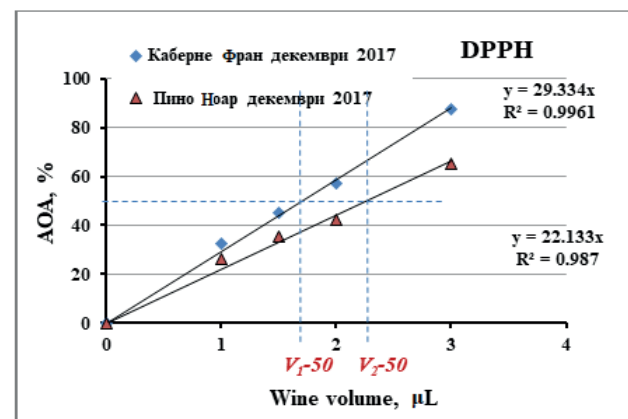


Таблица 3. Образци от вносни червени вина, използвани за сравнение

| Държава- регион     | Сорт грозде            | Реколта |
|---------------------|------------------------|---------|
| 1. Франция – Ница   | Каберне Совиньон       | 2016    |
| 2. Франция – Ница   | Малбек                 | 2016    |
| 3. Франция – Ница   | Сира                   | 2017    |
| 4. Франция – Ница   | Малбек                 | 2015    |
| 5. Франция – Париж  | Сира, Гренаш           | 2014    |
| 6. Франция – Париж  | Сира, Гренаш, Мурведър | 2015    |
| 7. Франция – Париж  | Каберне Совиньон       | 2015    |
| 8. Франция – Париж  | Сира и Гренаш          | 2016    |
| 9. Франция – Париж  | Сира                   | 2015    |
| 10. Франция – Париж | Мерло                  | 2015    |
| 11. Чили            | Мерло                  | 2013    |
| 12. Южна Африка     | Мерло                  | 2014    |
| 12. Италия          | Барбара ДиАсти         | 2013    |

АОА нараства с увеличаване на количеството на винените продукти и тази зависимост има добра линейност и за двете вина ( $R^2 = 0.987$  за *Каберне Фран* и  $R^2 = 0.997$  за *Пино Ноар*). Правата, съответстваща на виното от сорта *Каберне Фран*, има по-голям наклон спрямо правата, съответстваща на проби вино от сорт *Пино Ноар*. С помощта на уравнението на получената права могат да бъдат изчислени стойностите на V-50.

Вижда се, че колкото по-голяма е АОА, толкова стойността на V-50 е по-малка, тъй като по-малко количество винен образец е необходимо да се добави към реакционната смес, за да се елиминират половината радикали. На фигура 16 са показани зависимостите между АОА в системата, съдържаща DPPH радикал, и количество винен продукт (обем V-50) за изследваните проби червени вина.



Фиг. 16. Зависимост на АОА и количеството винен продукт за вина от сортовете Каберне Фран и Пино Ноар, получени в системата с DPPH радикали

От графиката се вижда, че вино *Каберне Фран* проявява по-голяма АОА от вино *Пино Ноар*, тъй като добавянето на 2 μl от *Каберне Фран* дава стойност на АОА около 60%, а добавянето на същото количество *Пино Ноар* – около 40%.

На фигура 17 са представени промените на обема V-50 при различните етапи на обработка на червените вина от района на Варна за ABTS и DPPH радикали. Пино Ноар през последния етап на обработка проявява най-голяма АОА за ABTS и DPPH радикали.

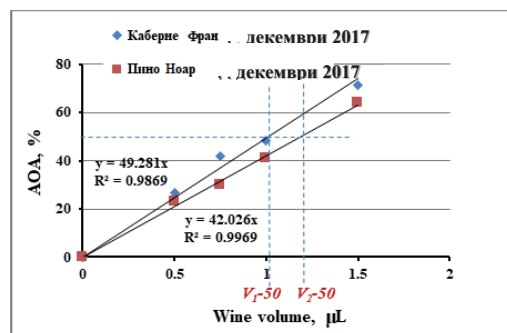
## ГЛАВА 5. ОЦЕНКА НА КИНЕТИЧНИ ПРОМЕНИ НА АНТИОКСИДАНТНАТА АКТИВНОСТ НА ВИНА ОТ ВАРНЕНСКИ РЕГИОН В РАЗЛИЧНИ СТАДИИ НА ТЯХНОТО РАЗВИТИЕ

Целта, поставена в тази глава, е чрез средствата на приложната фотоника да се проследят кинетичните промени в основни параметри, определящи качеството, сходството и различието на червени и розови вина от Варненски регион с такива от други райони на страната и чужбина.

Целта определя за решаване следните задачи:

- ❖ подбор на проби от розови и червени вина от слабо разпространени в България сортове грозде, като *Пино Ноар* и *Санджовезе*;
- ❖ сравняване на наблюдаваната антирадикална способност на пробите от червено вино, измерени с помощта на две групи аналитични методи (хемилуминесцентни и спектрофотометрични) и оценка на тяхната ефективност срещу стабилни свободни радикали и биологично значими АФК;
- ❖ проследяване кинетиката на АОА, количеството на антоциани, пълно фенолно съдържание и оптични характеристики на изследваните образци с цел окачествяване и принадлежност към една или друга група.

На фигура 15 е показана концентрационната зависимост между количеството на винен продукт и АОА за винени образци от два различни сорта: *Каберне Фран* и *Пино Ноар*, след алкохолна ферментация, в период на отпочиване (декември 2017 г.).



Фиг. 15. Зависимост на АОА и количеството винен продукт за вина от сортовете *Каберне Фран* и *Пино Ноар*, получени в система с *ABTS* радикали

## ГЛАВА 3. ПРИЛОЖЕНИЕ НА МЕТОДИТЕ НА ФОТОНИКАТА ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ ОПТИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ВИНА ОТ РЕГИОНА НА ЮЖНА БЪЛГАРИЯ

Целта, поставена в Глава 3, е свързана с получаване на емисионно-излъчвателни матрици на български бели и червени вина от различни региони и установяване на корелация между интензитета на флуоресцентните максимуми и техни компоненти, имащи важно значение за качеството им с оглед на здравословното хранене. За реализирането на тази цел са поставени следните задачи:

- ❖ снемане на флуоресцентните спектри на бели и червени вина от различни региони на България за дължина на вълната на възбуждане в УВ диапазон;
- ❖ намиране на корелация между флуоресцентните максимуми и типа на химичните съединения във винените образци;
- ❖ измерване на цветовите параметри в две колориметрични системи XYZ и SIELab с цел оценка стареенето на вина и определяне на характеристиките им, като интензитет, наситеност и ъгъл на Хю;
- ❖ С помощта на анализирания показател да се направи опит за създаване на дискриминантни модели за разпознаване на отделните вина по географски регион, реколта и тип.

Изследвани са вина сорт *Мерло* от района на Старосел и Първомай, които за по-добра визуализация са представени чрез двумерни контури с изолинии и тримерните емисионно-излъчвателни матрици, показани на фиг. 6.

При възбуждане на пробите с дължина на вълната при 245 nm се наблюдават пикове на излъчване в областта от 429 nm до 440 nm. Това показва наличие на някои фенолни киселини, като кафеена, галова и ферукова киселина, допринасящи за тези пикове на флуоресценция. При изследване на проби от вина, съдържащи грозде сорт *Мерло* и грозде сорт *Марселан*, се наблюдават допълнителни пикове, свързани с наличието на друг сорт грозде. При червено вино *Мерло резерва* се наблюдават допълнителни пикове, които се дължат на наличието на допълнителни пигменти. Те възникват поради специалната технология на обработка. Това са вина, подбрани от най-добрата реколта на сорта, които извън регулярната технология за стареене (от 6 до 12 месеца) допълнително стареят в бъчви от калифорнийски дъб в продължение на две години. Използването на тримерни емисионно-излъчвателни матрици има своите предимства и недостатъци. Тримерните масиви са подходящи при анализ на смеси. Неудобство при тях е ъгълът, под който се наблюдават. Те

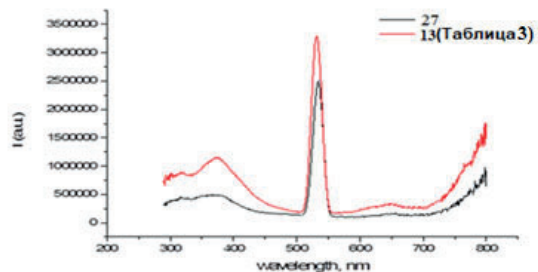
представяват изображения в тримерно пространство и служат най-вече при обработка на пробите с цел създаване на модели. Използването на изолинии е удобен метод за математическа обработка и моделиране по сорт и регион, защото погледът отгоре винаги е един и същ и представлява „индивидуален пръстов отпечатък“ на пробата.

Според научната хипотеза в предложениия тезис флуоресцентната емисионно-излъчвателна спектроскопия е ефективно средство за създаване на експресни методи за качествена оценка на вино, свързана с процеса на контрол на образците, географския регион, начина на обработка на гроздето и други параметри, имащи значение за здравословния ефект върху организма. В Глава 3 е направен преглед на основните показатели, характеризиращи идентичността на винени образци посредством обобщение и представяне на възможност за използване на съвременни методи за доказване на корелации между оптичните характеристики и параметрите, свързани с качеството на виното.

Доказано е, че за разработка на метод за качествена оценка на антиоксидантните свойства и търсените от потребителя качества на образците е необходимо комплексно използване на средствата на приложната фотоника (емисионно-излъчвателни матрици) и видима спектроскопия [A<sub>1</sub>]. Доказано е, че не е възможно създаване на универсално класифициращ модел по регион за червени и бели вина [A<sub>1</sub>]. По година на производство според посочените параметри се класифицират белите вина с почти 100% разпознаваемост, докато за червените грешката е относително голяма (полученият модел дава разпознаваемост около 70%).

Последният показва като определящи за групирането на червените вина параметри, свързани с оценката на потребителя – интензитет на цвета, блясък, нюанс и други параметри, свързани с качеството на виното – АОА, количество на антоциани и др. [A<sub>3</sub>].

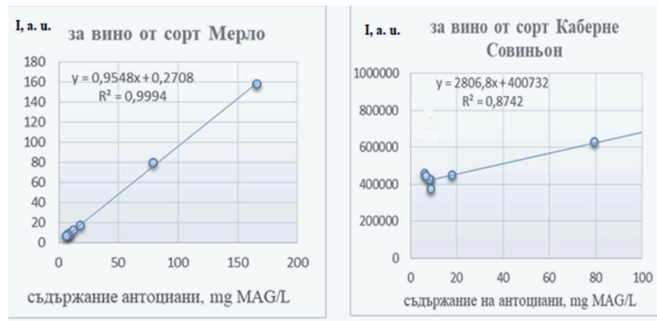
В резултат на получените така наречени пръстови отпечатъци може да бъде направен изводът, че флуоресцентната спектроскопия може да бъде използвана за детайлна обработка на тримерните емисионно-излъчвателни матрици с цел характеризирание на количеството на даден сорт грозде във вино, получено при комбиниране на няколко сорта грозде с цел подобряване на вкусовите му характеристики и АОА.



Забележка: Номерата в легендите на фигура 13 в) съвпадат с номерата на образците от таблица 2 и таблица 3

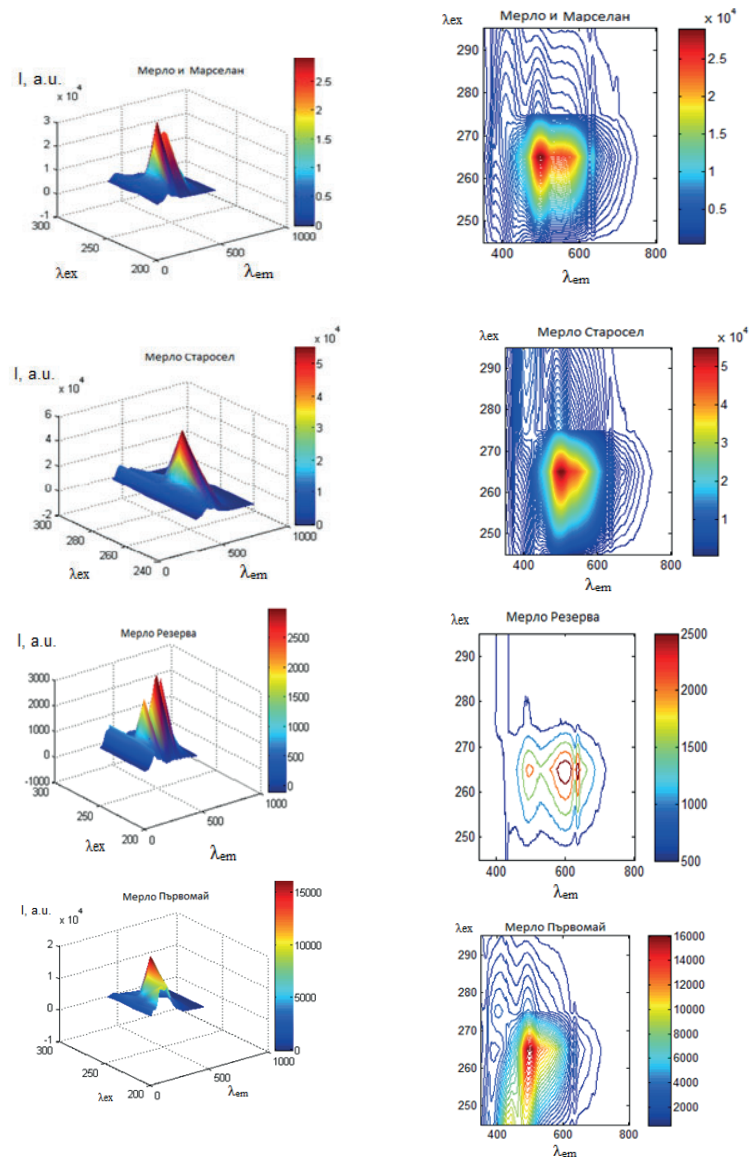
**Фиг. 13 в) Флуоресцентни спектри на купажни червени вина при  $\lambda_{ex} = 265 \text{ nm}$**

Установени са корелационни зависимости между интензитета на излъчване на пробите I<sub>350-360/265</sub> и съдържанието на антоциани. Резултатите са представени на фигура 14.

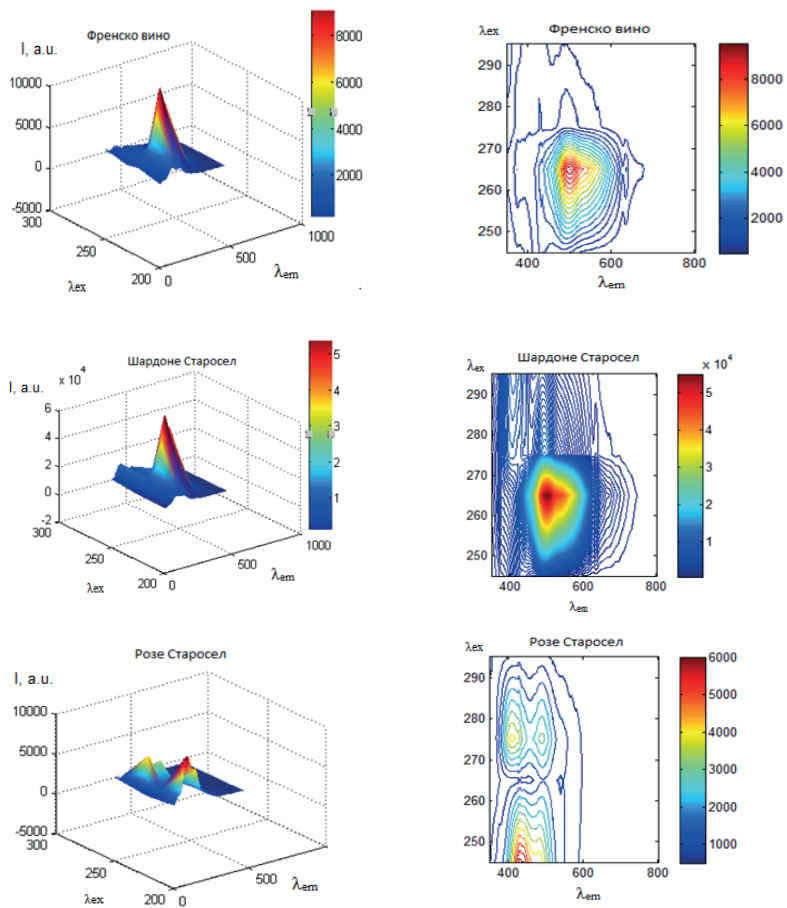


**Фиг. 14. Регресионни зависимости между интензитета на флуоресцентните максимуми и съединения с антиоксидантен ефект при възбуждаща светлина с дължина на вълната 265 nm за вина сорт Мерло и Каберне Совиньон**

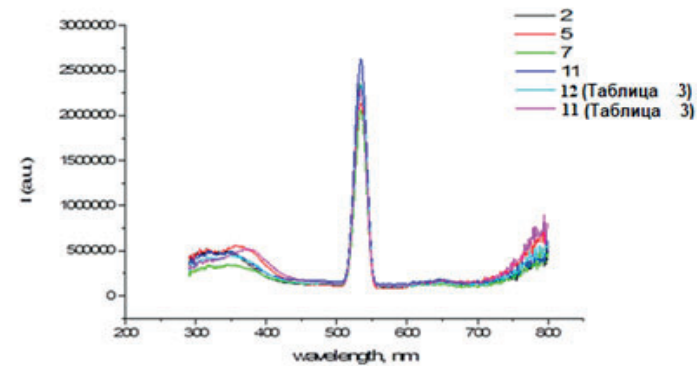
В резултат на направените изследвания е доказано, че за винени образци от един и същи сорт е възможно количествено определяне на антоцианите по емисионния интензитет на флуоресценция I<sub>350-360/265</sub>. За червените вина от сорт грозде Каберне и Мерло беше създаден модел чрез използване на фактор-анализ.



**Фиг.6. Двумерни контури с изолинии и тримерни матрици за вина от грозде сорт Мерло**

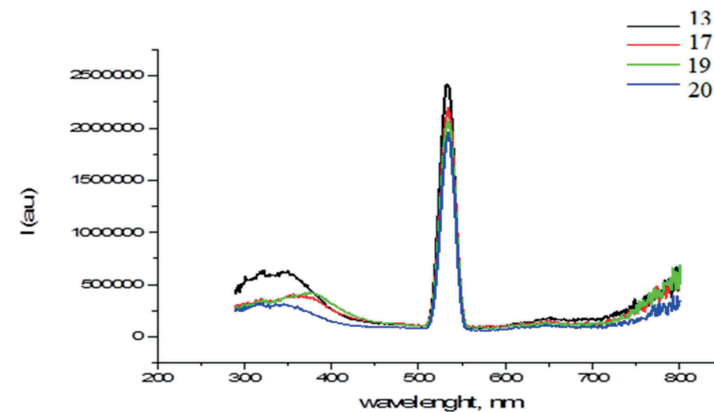


Фиг. 7. Двумерни контури с изолинии и тримерни масиви за бели вина и розе



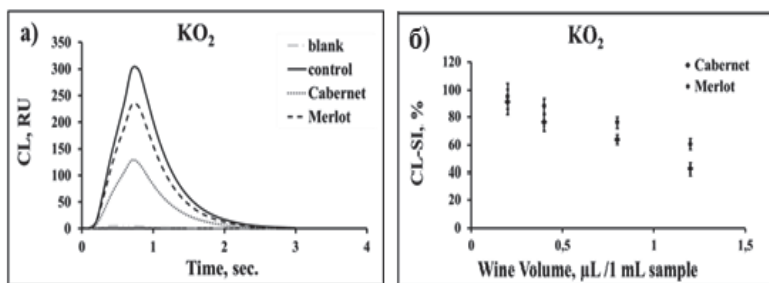
Забележка: Номерата в легендите на фигура 13 а съвпадат с номерата на образците от таблица 2 и таблица 3

Фиг. 13 а) Флуоресцентни спектри на червени вина от сорт Мерло при  $\lambda_{ex} = 265 \text{ nm}$



Забележка: Номерата в легендите на фигура 13 б) съвпадат с номерата на образците от таблица 2 и таблица 3

Фиг. 13 б) Флуоресцентни спектри на червени вина от сорт Каберне Совиньон при  $\lambda_{ex} = 265 \text{ nm}$



Фиг. 12 а), б) Типични хемилуминесцентни криви на проби от вино от сорт Каберне и Мерло, получени в супероксидсъдържаща система

Потърсена е връзка между съединенията, свързани с антиоксидантния ефект на червените вина и спектъра на флуоресценция на образците. За целта винените проби са възбуждани с дължина на вълната на светлината от УВ диапазона – 265 nm, 275 nm и 295 nm.

Изследваните проби червени вина от сорт Мерло и Каберне Совиньон се характеризират с два основни максимума на флуоресценция при дължина на вълната на възбуждане 265 nm, единият – в областта 350-360 nm, свързан със съдържанието на антоцианини, другият – с дължина на вълната от 335 nm до 405 nm, който е свързан с наличие на танини. Наблюдават се и флуоресцентни излъчвания при дължина на вълната 340 nm с максимум на възбуждане около 275–295 nm, които се свързват с наличие на фенолни киселини, като ванилова и ферулова киселина. Интензивен флуоресцентен пик се наблюдава в интервал 320–325 nm за дължина на вълната на възбуждане 275 nm. Полученият флуоресцентен максимум е свързан със съдържание на катехини. Според (Lakowicz R., 2006, Silvana M. et al, 2015) този максимум е свързан и със съдържание на триптофан и тирозин.

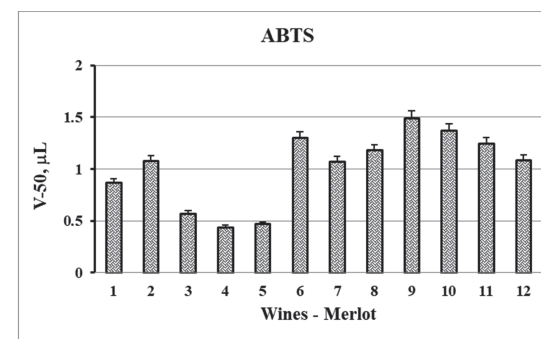
Отделният флуоресцентен спектър не може да даде ясна представа за различията между образците червено вино от различен сорт. Затова на фигури 13 а), 13 б), 13 в) са представени флуоресцентните спектри на червени вина от сорт Мерло и Каберне Совиньон за дължина на вълната на възбуждащата светлина 265 nm, с цел да бъдат показани посочените по-горе пикове. За всички изследвани проби са получени емисионно-излъчвателните матрици и контурни карти, които могат да служат като „пръстови отпечатащи“ за червено вино от даден сорт.

#### ГЛАВА 4. ПАРАМЕТРИ НА ПРИЛОЖНАТА ФОТНИКА И АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ ЗА ЕКСПРЕСНО ОКАЧЕСТВЯВАНЕ НА ЧЕРВЕНИ ВИНА

В тази глава са представени резултатите от изследвани червени вина от определен сорт грозде, като Мерло, Каберне Совиньон, Сира, Малбек, Памид и Каберне Фран, от различни региони на България. Целта, поставена в настоящето изследване, е да се оцени качеството на винени образци от избрани сортове български вина чрез параметри на приложната фотоника, цветови показатели и АОА, както и получаване на корелационни зависимости между отделните параметри. За постигане на целите е необходимо:

- ❖ подбиране на червени вина от определен сорт грозде от различни региони на България;
- ❖ изследване на АОА по два химични метода – АВТС и DPPH;
- ❖ откриване на корелация между АОА и параметрите, измерени с методите на приложната фотоника;
- ❖ експресно окачествяване на вина на база на установените корелации.

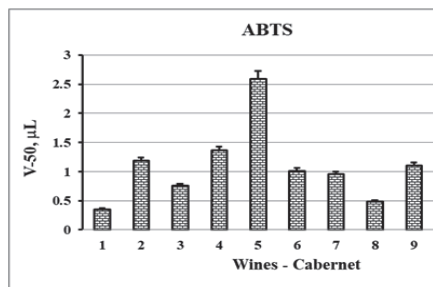
Изследваните вина показват по-висока АОА в тестваната моделна система с АВТС радикали. На фигури 8 и 9 е показана АОА по АВТС метод, представена чрез стойностите на V-50 на български вина от сорт Мерло и сорт Каберне. Най-малки са стойностите на V-50 при АВТС метода за купажните вина, което показва, че тези вина проявяват най-голяма АОА.



Забележка: Пробите с номера от 1 до 12 съответстват на образци от 1 до 12 в таблица 2

Фиг. 8. Антиоксидантна активност по АВТС метод, представена чрез стойностите на V-50 на български вина от сорт Мерло



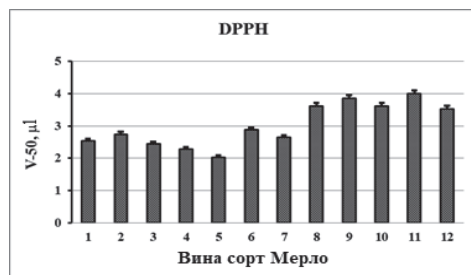


Забележка: Пробите с номера от 1 до 9 съответстват на образци от 13 до 21 в таблица 2

**Фиг. 9. Антиоксидантна активност по ABTS метод, представена чрез стойностите на V-50 на български вина от сорт Каберне**

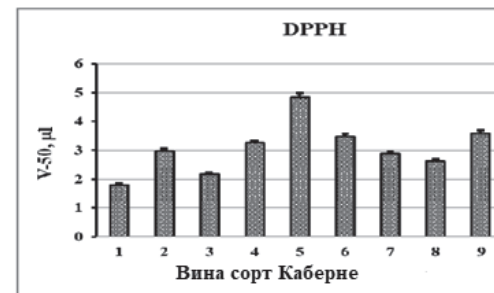
Най-висока АОА по ABTS притежават вината от сорт *Мерло* и *Каберне Совиньон* в района на Харманли и най-ниска тези от сорт *Каберне Совиньон* от района на Северна България. Следователно зависимостта от климатичните и почвени условия на региона са определящи за АОА по отношение на типа вино. Този факт се свързва и със синергичното действие на антоцианите.

Между количеството винен продукт, който е добавен в реакционната смес и АОА, съществуват аналитични зависимости, които са изчислени чрез стойностите за V-50 по метода DPPH за вина от сорт *Мерло* и сорт *Каберне*, представени на фигури 10 и 11.



Забележка: Пробите с номера от 1 до 12 съответстват на образци от 1 до 12 в таблица 2

**Фиг. 10. Антиоксидантна активност по DPPH метод, представена чрез стойностите на V-50 на български вина от сорт Мерло**



Забележка: Пробите с номера от 1 до 9 съответстват на образци от 13 до 21 в таблица 2

**Фиг. 11. Антиоксидантна активност по DPPH метод, представена чрез стойностите на V-50, на български вина от сорт Каберне**

За експериментите, свързани с изследване на скевинджър ефекта на вина от сортове *Мерло* и *Каберне Совиньон*, е използвана хемилуминесценция, даваща възможност за оценка способността на изследваните проби да взаимодействат с активната форма на кислород (АФК) с ниска концентрация. Поради липсата на селективност луминолът може да реагира с всички генерирани в извадката АФК, което дава възможност да се сравнят резултатите от различните моделни системи, съдържащи различни реактивни кислородни видове. На фигура 12 а) са представени типични хемилуминесцентни криви след добавяне на еквивалентна представителна проба вино от всеки от двата избрани сорта *Мерло* и *Каберне Совиньон* и на фигура 12 б) е представена линейната зависимост между хемилуминесцентния индекс на поглъщане от общия краен винен продукт, добавен към разтвор от милилитър проба. За да се елиминира възможността наблюдаваният ефект да се дължи на наличието на етанол в крайния винен продукт, бяха извършени опити с проби, които имат еквивалентно количество етанол спрямо този, маркиран на етикета на пробата вино. Тези свойства на етанола зависят от тестваната концентрация, затова е приготвен разтвор, който след разреждане да отговаря на съдържанието му във винените образци. Получените резултати показват значително намаляване на хемилуминесцентното излъчване, съответстващо на по-ниска концентрация на супероксидните анионни радикали в пробите, съдържащи винен продукт. Наблюдаваният ефект има линейна концентрационна зависимост и доказва наличието на компоненти, притежаващи поглъщаща активност срещу  $O_2$  в тестваните проби.