



**ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ
С ЦЕНТЪР ПО ФИТОХИМИЯ
БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**



Десислава Пламенова Гергинова

ЯМР МЕТАБОЛОМИКА НА ПЧЕЛЕН МЕД И ВИНО

АВТОРЕФЕРАТ

**на Дисертация за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор”**

Професионално направление 4.2. „Химически науки“

Научна специалност: „Органична химия“

**Научни ръководители: проф. дхн Светлана Симова
гл. ас. д-р Явор Митрев**

София, 2022 г.

Изследванията, свързани с дисертационния труд са проведени в Институт по органична химия с Център по фитохимия – Българска Академия на Науките (ИОХЦФ-БАН), „Център по ЯМР спектроскопия“ и лаборатория „Органичен синтез и стереохимия“.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от колоквиум „Природни и синтетични биологично активни съединения“ при ИОХЦФ-БАН на 31.05.2022 г.

Дисертацията съдържа 235 страници и включва 84 фигури, 3 схеми и 26 таблици. Цитирани са 326 литературни източника. Резултатите са отразени в 4 научни публикации и са представени на 18 научни форума.

Номерацията на фигурите в автореферата отговаря на използваната в дисертацията.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на септември 2022 г. през електронната платформа *MS Teams*, на открито заседание на Научното жури.



*И най-важното,
гледай с блясък в очите
целия свят около теб,
защото най-великите тайни
винаги са скрити
на най-неочаквани места.
Тези, които не вярват в магията,
никога няма да я намерят.*

Роалд Дал

Съдържание

Глава 1. Въведение	1
Глава 2. Резултати и обсъждане	3
2.1. Пчелен мед	3
2.1.1. Качествен и количествен състав на органични компоненти в мед	3
2.1.2. Разграничаване на мед по ботанически произход	6
2.1.3. Разграничаване на мед по ентомологичен произход	9
2.1.4. Разграничаване на мед по географски произход	10
2.1.5. Различаване на истински мед от разреден мед и сиропи	12
2.1.6. Оптичен ъгъл на пчелен мед	13
2.2. Вино	16
2.2.1. Качествен и количествен състав на органични компоненти във вино	16
2.2.2. Разграничаване на вина по сорт грозде, използван при производството му	17
2.2.3. Различаване на истинско от разрежено вино	20
2.2.4. Сравнение на синьо вино и розе. Разграничаване на червено вино с протекла мацерация от червено вино без мацерация	21
2.2.5. Разграничаване на вино от типично български сортове грозде	21
2.2.6. Разграничаване на вино по географски произход	23
2.3. Други продукти с високо съдържание на захари	25
2.3.1. Медовина	25
2.3.2. Борово сладко	28
Глава 3. Заключение	32
Глава 4. Литература	33

Списък с фигури

Фигура 37. Едномерен TOCSY спектър на хиновоза (в червено) и ^1H спектър на пчелен мед – <i>сml4</i> (в сиво) _____	4
Фигура 40. Сравнение на количествените резултати (в г/100 г), получени чрез ЯМР спектроскопия и чрез течна хроматография (използвана от БАБХ) _____	5
Фигура 43. Графика на резултатите от приложен PLS-DA анализ, включващ 299 проби пчелен мед и сиропи, разделени в 19 класа _____	7
Фигура 46. Информация от дърво на решенията, разграничаващо проби от 16 ботанически вида мед _____	9
Фигура 47. Диаграма на <i>Nightingale</i> , показваща разликите между мед от европейски (<i>Apis</i>) и от безжилни пчели (<i>bn</i>) _____	10
Фигура 49. а) Графика на резултатите за 100 проби нектарен мед; б) Биплот _____	11
Фигура 51. Двумерна графика на резултатите, получена чрез OPLS-DA анализ за разграничаване на дъбов манов мед от различни области и държави _____	12
Фигура 53. Стойности за съотношенията Ma/G и Su/G, получени от 300 въглеродни ЯМР спектри _____	13
Фигура 55. Големина на специфичен ъгъл на въртене при различни видове мед (разреден (pp), от липа (лп), рапица (ра), акация (ац), магарешки бодил (мб), многоцветен (мн), мащерка (мщ), кориандър (кор), смесен (см), дъб (д), иглолистна растителност (иг), кестен(кт)) и сладко от борови шишарки (бш) _____	14
Фигура 56. а) Пресметнати $[\alpha]_{\text{пр}}$ и експериментални $[\alpha]_{\text{ек}}$ стойности на специфичен ъгъл за 41 проби мед и една проба сладко. _____	15
Фигура 62. Двумерна графика на резултатите от приложен LDA анализ, целящ разграничаване на пробите вино по използван сорт грозде _____	18
Фигура 64. Обобщена информация от дърво на решенията, позволяващо разграничаване на едносортови вина, произведени от 15 различни вида грозде _____	20
Фигура 66. Количество (мг/л) на 15 вещества и процентно съдържание на основните 7 от тях в 4 вида вино _____	20
Фигура 70. Двумерна графика на резултатите към приложен OPLS-DA анализ, позволяваща различаване на вино от български (бг) и международни (чс) сортове грозде _____	22
Фигура 71. Диаграми на <i>Nightingale</i> , сравняващи съдържанието на местни български и чуждестранни бели и червени вина _____	22
Фигура 72. Тримерна графика на резултатите и принос на отделните компоненти за бели вина, произведени в Дунавска равнина (ДР) и Тракийска низина (ТН)) _____	23
Фигура 74. ^1H ЯМР спектри на мед (манов и нектарен), медовина и вино (бяло и червено) _____	26
Фигура 75. <i>Venn</i> диаграма, описваща прилики в броя на съединенията, установени в проби мед, вино и медовина _____	26
Фигура 77. Дендрограма, включваща групиране на проби мед, вино и медовина и разстояние между отделните клъстери _____	27
Фигура 79. Сравнение на ^{13}C ЯМР спектри на проби сладко и мед _____	29
Фигура 80. Двумерна графика на резултатите и биплот от приложен PCA анализ _____	30
Фигура 83. Диаграма на <i>Nightingale</i> , сравняваща захарен профил на сладко от борови шишарки (<i>бш</i>) и сладко от борови връхчета (<i>бв</i>) _____	30

Списък на често използваните съкращения

АФ – Алкохолната Ферментация

ЗГУ – Защитено Географско Указание, *PGI*

ЗНП – Защитено Наименование за Произход, *PDO*

ЯМКФ – Ябълчено-МлечноКисела Ферментация

ЯМР спектроскопия – спектроскопия на Ядрен Магнитен Резонанс, *NMR*

ANOVA – **AN**alysis **Of** **V**ariance, дисперсионен анализ

COSY – **CO**rrelation **S**pectroscop**Y**, хомоядрена корелация

HSQC – **H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence, хетероядрена корелация за определяне на взаимодействия през една връзка

IHC – **I**nternational **H**oney **C**ommission, Международната комисия по меда

LDA – **L**inear **D**iscriminant **A**nalysis, линеен дискриминантен анализ

OIV – *фр.* **O**rganisation **I**nternationale de la **V**igne et du **V**in, Международна организация по лозата и виното

OPLS-DA – **O**rthogonal **P**artial **L**east **S**quares **D**iscriminant **A**nalysis, ортогонален дискриминантен анализ по метода на частичните най-малки квадрати

PCA – **P**rincipal **C**omponent **A**nalysis, анализ на главните компоненти

PLS-DA – **P**artial **L**east **S**quares **D**iscriminant **A**nalysis, дискриминантен анализ по метода на частичните най-малки квадрати

TOCSY – **T**otal **C**orrelation **S**pectroscop**Y**, тотална хомоядрена корелация

VIP – **V**ariable **I**nfluence on **P**rojection, параметър за влияние на променливата върху проекцията

Глава 1. Въведение

През изминалите две столетия броят на измамите с хранителни продукти се увеличава многократно, като те представляват сериозен проблем за икономиката, индустрията и здравето на човека. Всяка година фалшифицирането на различни храни в световен мащаб води до икономически загуби на стойност 10-15 млрд. долара, като засяга над 10 % от всички продадени хранителни продукти.¹ Въпреки ежегодните операции за борба с измамите по храните,² броят на фалшифицираните продукти продължава да расте, като според някои изследвания финансовите печалби от този вид дейности са сравними с тези от трафика на кокаин.³ Точният им брой е неизвестен, тъй като голяма част от фалшифицираните храни не оказват пряко въздействие върху здравето, а често потребителите не забелязват проблеми с качеството на продуктите. Примери за фалшифициране на различни хранителни продукти като вино, черен пипер и зехтин са описани през Античността, а множество методи за подправяне на чай, хляб, кафе, бира и други продукти са използвани през Средновековието. В днешно време сред най-често имитираните храни са зехтин, риба и морски дарове, месо, мляко и млечни продукти, зърнени култури и пшенични продукти, пчелен мед, кафе и чай, подправки, плодов сок, вино и други алкохолни напитки. Сред най-често срещаните методи за измами с храни са:

- ◆ фалшифициране, включващо разреждане, замяна на декларирани скъпоценни съставки с по-евтини и/или добавяне на неодобрени съставки (неизвестни и/или недекларирани вещества), както и прикриване на някои съставки и процеси при производство,
- ◆ умишлено неправилно етикетироване на храни, изразяващо се в представяне на по-евтин продукт като по-скъп, което обикновено е свързано с промяна на географски и/или ботанически произход, метод и година на производство.

Причини за измамите са икономически и включват желание за по-големи финансови печалби, недостиг на даден хранителен продукт и повишаване на цените на храните, силна конкуренция, трудност при проследяване произхода на стоките, ниска вероятност от установяване на нарушение и недостатъчен размер на наказанието. Европейският съюз приема различни закони и разпоредби, с които да защити традиционните храни в различни региони, но не разполага с общопризнато законодателство и норми, свързани с фалшифицирането на храни. Изследванията на измамите с храни напредват, но много от използваните за фалшифициране съставки остават трудни за откриване. Разработваните методи за анализ трябва по възможност да бъдат бързи, недеструктивни и евтини. За определяне на автентичността на различни хранителни продукти е необходимо откриване на малки разлики в химичните профили на храните, свързани с произхода им, както и създаване на надеждни бази данни, включващи голям брой вещества и проби, което позволява прилагане на различни статистически методи.⁴ Метаболомика е метод, позволяващ едновременно характеризиране на множество компоненти в биологични матрици, който предлага възможности за идентифициране на хранителни вещества, определяне на качество и автентичност на храни.⁵ През изминалото десетилетие ЯМР метаболомиката показва значителен потенциал за справяне с контрол на качеството, автентичността, мониторинг на процесите на производство и съхранение на различни хранителни продукти като плодов сок, зехтин, оцет, вино, бира, мляко, кафе, черен и зелен чай, шафран, пчелен мед, сирене, пилешко

месо, свинско месо, риба, наденица, зърнени култури, някои плодове и зеленчуци (грозде, киви, домати, маруля, пъпеш, морков), както и много други.^{6,7,8}

България притежава вековни традиции в производството на пчелен мед и вино, но тези продукти са слабо проучени, а изследвания за техния състав и химичен профил са много оскъдни. По официални данни в България се произвеждат 10-12 хил. тона мед годишно и 130-140 млн. литра вино, като около 2/3 от пчелния мед и около половината от виното се изнасят.⁹ Напоследък държави като Южна Африка, Китай и Украйна внасят по-евтин от българския мед, често с по-ниско качество, като част от него бива представян за български. Измамите с вино в България основно са свързани със сивия пазар. Сериозен проблем представлява и правилното етикетирание на българското вино или неговото разреждане.

Въз основа на посочените по-горе съображения, установеният недостатъчен контрол от държавните органи върху хранителните стоки в страната и непрекъснатата необходимост от нови, бързи и надеждни анализи е формулирана темата на настоящата дисертация – *„ЯМР метаболомика на пчелен мед и вино“*. Основна цел е разработване на ЯМР методи за определяне на качеството и автентичността на различни видове пчелен мед, вино и други продукти с високо съдържание на захари, както и включването им в бази данни. Основните задачи са:

1. Идентифициране и количествено определяне на органични компоненти в често срещани видове пчелен мед и вино посредством ЯМР спектроскопия;
2. Определяне на характеристични компоненти в единствения български мед със **Защитено Наименование за Произход (ЗНП)** – Странджански дъбов манов мед;
3. Различаване на мед и вино по ботанически и/или географски произход чрез прилагане на хеометрични методи, както и установяване на разреждане;
4. Различаване на традиционни за България вина от местни сортове грозде;
5. ЯМР метаболитно профилиране на борови сладка и медовина.

Глава 2. Резултати и обсъждане

2.1. Пчелен мед

През последното десетилетие пчелният мед обикновено е сред трите най-често фалшифицирани хранителни продукта в света. Въпреки задълбочените изследвания върху неговия състав през изминалите две десетилетия, все още няма приети универсални методи за неговия анализ и за доказване на автентичността и качеството му. Нараства необходимостта от надеждно идентифициране и количествено определяне на основните органични вещества в меда и създаването на свободна и достоверна база данни за мед с различен ботанически, ентомологичен и географски произход, както и доказване на компоненти, чрез които се разграничават. За установяване на специфичния състав на единствения български мед със ЗНП (Защитено Наименование за Произход) – Странджански манов мед е нужно определяне на компонентите, по чиито количества е възможно различаване на типичния за регион Странджа дъбов манов мед от дъбов мед, произведен в други области и държави. С цел доказване качеството на меда, трябва да бъдат определени веществата или съотношенията между тях, които позволяват ясно отличаване на истински от разреден пчелен мед. Необходима е и проверка на надеждността на метода, използващ оптичен ъгъл на въртене за разграничаване на манов от нектарен мед, както и откриване на захаридите, оказващи съществено влияние върху големината и посоката на специфичния ъгъл на пчелния мед.

2.1.1. Качествен и количествен състав на органични компоненти в мед

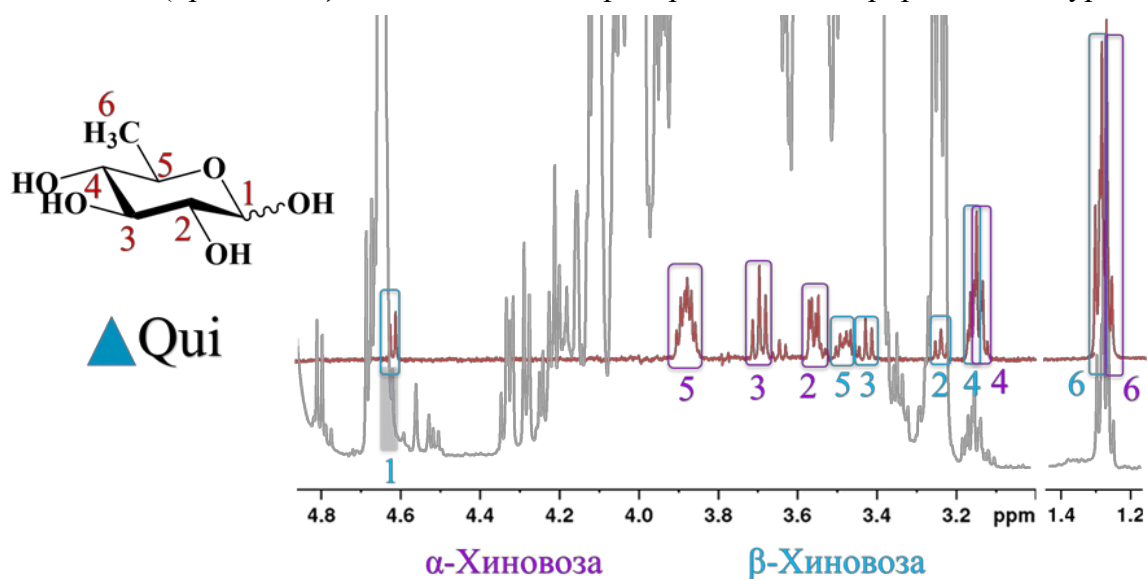
В литературата са налични множество ЯМР методологии за определяне на вещества в мед, включващи различни импулсни поредици и различна пробоподготовка с големи разлики в количеството използван мед. До този момент няма утвърден протокол за анализа, но за получаване на надеждни количествени резултати и тяхното валидиране се препоръчва регистриране на спектри при температура 300 K.¹⁰

С цел определяне на оптималното количество мед за приготвяне на проби са регистрирани ¹H ЯМР спектри на четири проби с различни концентрации, покриващи целия обхват на описаните в литературата методи за пробоподготовка. За регистрирането им са използвани стандартни параметри и импулсна поредица *zg30*, а като стандарт – сигналят на TSP (0.00 м.ч.). Независимо от концентрацията на пробата в спектър с 1 акумулация се наблюдава сигнал за вода и множество сигнали за основните захариди – глюкоза и фруктоза. При проби с висока концентрация на мед, 0.5 г мед в 0.6 мл D₂O, в спектрите се отличават и сигнали на пролин и фенилаланин, като се забелязва силно уширяване на сигналите и лоша разделителна способност, поради което тази концентрация не е подходяща за регистриране на ¹H спектри. Оптимални концентрации за получаване на ¹H спектри с добра разделителна способност са в интервала 23-320 мг пчелен мед в 0.55-0.6 мл D₂O или деутериран буферен разтвор.

За установяване на други компоненти в мед, поради високото съдържание на вода и ниската чувствителност на ЯМР спектроскопията е необходимо прилагане на импулсна поредица с потискане сигнала на водата. Най-подходяща последователност е определена чрез сравнение на ¹H спектри, регистрирани чрез две често прилагани импулсни поредици в метаболомните изследвания – *zgcprr* и *noesypr1d*. Сравнението на спектрите показва малка разлика в интензивността на някои сигнали при прилагане на импулсната последователност *noesypr1d*. Импулсната поредица *zgcprr* води до по-нисък и по-тесен

воден сигнал с минимално въздействие върху близките сигнали и по-добро съотношение сигнал/шум.

Наличието на множество вещества с близки структури (захариди, аминокиселини, органични киселини) води до припокриване на много сигнали в ^1H ЯМР спектрите и до трудно идентифициране и количествено определяне на някои от компонентите. Надеждното еднозначно идентифициране на 46 компонента е извършено чрез регистриране на двумерни спектри (JRES, COSY, TOCSY, HSQC и sHSQC), чрез спектри на 21 индивидуални захариди и чрез литературни данни. Селективен едномерен TOCSY експеримент, прилаган често при целеви метаболомни изследвания, е използван за разпознаването на редуциращия монозахарид хиновоза, чието наличие в пчелен мед бе описвано от нас за първи път.¹¹ TOCSY спектър на хиновоза, както и ^1H спектър на пчелния мед (проба *см14*), в който бе идентифицирана, са илюстрирани на Фигура 37.



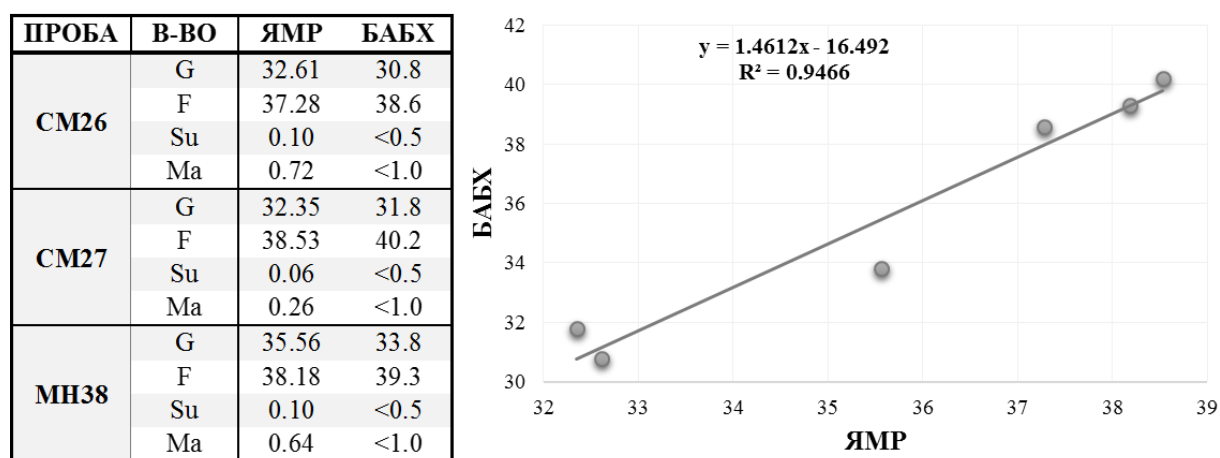
Фигура 37. Едномерен TOCSY спектър на хиновоза (в червено) и ^1H спектър на пчелен мед – *см14* (в сиво)

Припокриване на много сигнали в протонните спектри на мед е причина за неуспешното прилагане на ^{13}C ЯМР спектри за количествено определяне на захариди. С цел определяне на оптималните условия за регистриране на ^{13}C ЯМР спектри приложихме импулсна поредица с 90° импулс, описана от *Kazalaki*,¹² както и с 30° импулс, за измерване на различни концентрации на мед на пробите. Установихме, че не е възможно количествено определяне на голям брой компоненти в проби с мед под 120 мг за 0.6 мл, както и при използване на параметрите, описани от *Kazalaki*.¹² При прилагане на 30° импулс за проби с концентрации над 320 мг за 0.55-0.6 мл, използваното количество мед не подобрява количествения анализ на веществата.

За количествено определяне на компонентите от въглеродните ЯМР спектри на мед използвахме сигнали на първични въглеродни атоми, предимно от аномерната област (105-89 м.ч.) или други неприпокривани сигнали, установени в цялата ширина на спектъра. За вътрешен стандарт избрахме сигнала на α -фруктофураноза с химично отместване 104.34 м.ч, съответстващ на -2.84 м.ч. за сигнала на TSP. За всеки захарид е избран само по един сигнал, като за определяне на количеството на захарида е използвана височината на сигнала, моларната маса (г/мол) и коефициент, съответстващ на процента за избраната тавтомерна форма на редуциращия захарид, определен от ЯМР

спектъра му в D₂O. Моларните маси на неидентифицираните вещества са определени чрез дифузионен експеримент (DOSY). Коефициентите им на дифузия са между коефициентите за моно- и дизахариди, като за всички неидентифицирани вещества използвахме моларна маса, равна на 200 г/мол. Стойностите за всички компоненти са сумирани, като е определено процентното съдържание за всяко вещество в меда. За съдържание на вода избрахме стойност от 20%. Количествата на съединенията изчислихме в г/100 г.

На Фигура 40, с цел определяне точността на използваната методика, резултатите от ¹³C ЯМР спектри на проби *см26*, *см27* и *мн38* са сравнени с резултати от течна хроматография (използвана в БАБХ и призната от Международната комисия по меда). Методът на БАБХ определя единствено захаридите глюкоза, фруктоза, захароза и малтоза.



Фигура 40. Сравнение на количествените резултати (в г/100 г), получени чрез ЯМР спектроскопия и чрез течна хроматография (използвана от БАБХ)

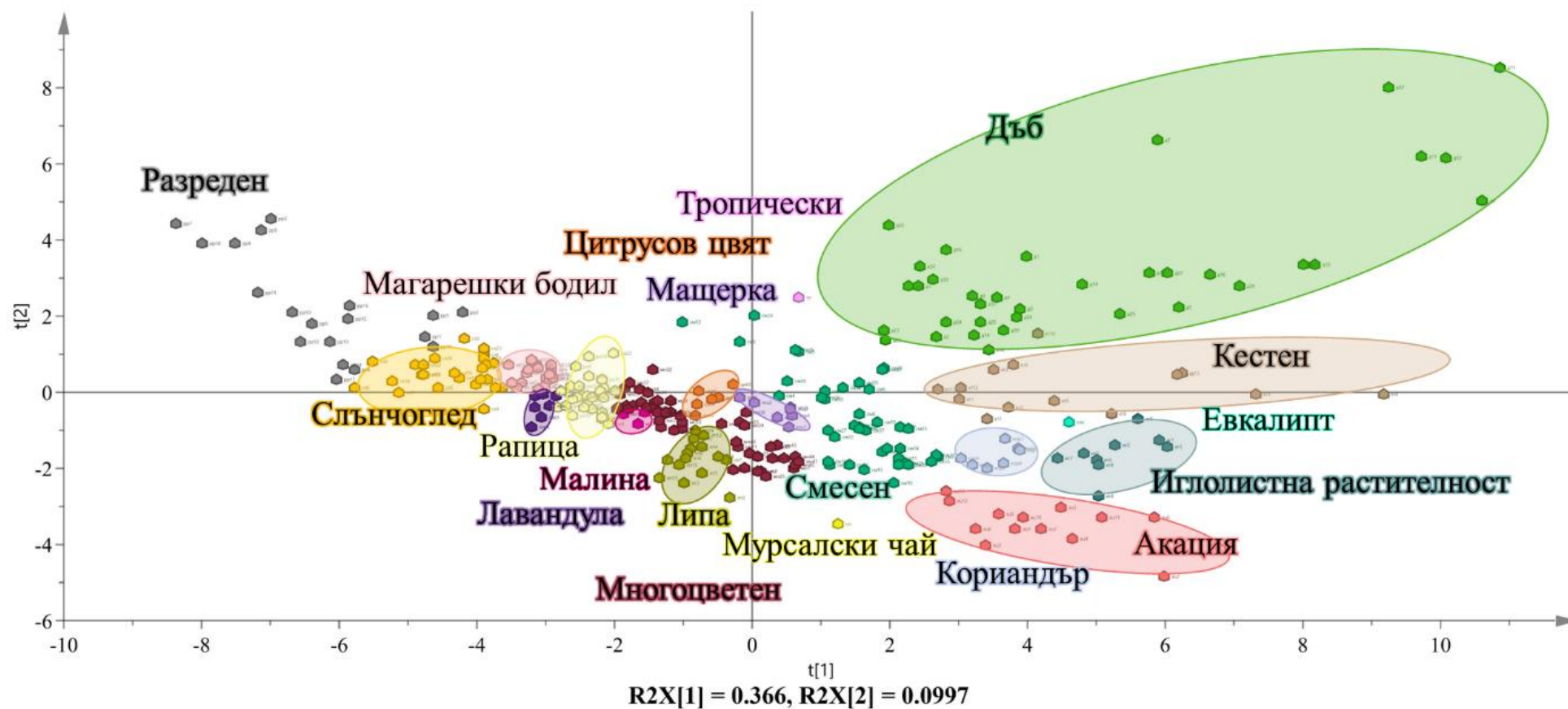
Разликата между получените резултати от БАБХ и ¹³C ЯМР спектри е малка – между 2 и 6%, което се вижда и от изобразената графика. Тази разлика попада в точността на метода, използван в БАБХ $\pm 10\%$.

Чрез количествен ¹³C ЯМР метод за 300 проби мед (292 от медоносната пчела *Apis mellifera*, една от безжилни пчели и 7 сироп, използвани за разреждане на мед) са определени 2 монозахарида (глюкоза и фруктоза), 13 ди- (гентиобиоза, захароза, изомалтоза, изомалтулоза, коджибиоза, леукроза, малтоза, малтулоза, нигероза, α -трехалоза, α -трехалоза, трехалулоза, тураноза), 7 три- (ерлоза, изокестоза, изопаноза, малтотриоза, мелецитоза, паноза, рафиноза), 1 тетразахарид (малтотетраоза), 2,3-бутандиол (мезо и R*S*), кверцитол, пролин и 16 неидентифицирани вещества (U1-U16). Изопаноза и изомалтулоза са установени единствено в мед от мурсалски чай, като концентрациите им са съответно 0.18 г/100 г и 1.61 г/100 г.¹³ В разреден мед и в често използваните захарни сиропи (клас *pp*) се установява, че средната стойност на количеството малтоза 12.23 г/100 г е много по-високо в сравнение с другите видове мед – от 0.72 до 1.36 г/100 г. Пробите от клас *pp* съдържат предимно глюкоза, фруктоза, малтоза и малтотриоза, докато в мед, разреден със захарен сироп (*pp12*) измерихме високо съдържание и на захароза – 10.25 г/100 г, при средна стойност за останалите проби 0.29 г/100 г. Тези резултати потвърждават литературните данни на *Cagliani* и на *Musharraf* за висока концентрация на малтоза в разреден мед.^{14,15} Количествените данни

показват много по-голямо количество гентхиобиоза в липов мед – 0.49 г/100г в сравнение с останалите видове – около 0.06 г/100 г, като дизахаридът е вероятен маркер за мед от липа, установен и от *Kortesniemi* във финландски липов мед.¹⁶ Забелязва се високо съдържание на мезо-2,3-бутандиол в дъбов манов мед 0.11 г/100 г при средни стойности от 0 до 0.05 г/100 г и на неидентифицирано вещество *U10* – в акациев мед (0.15 г/100 г). Сравнение на получените от нас данни за различните ботанически видове мед с описаните в литературата оскъдни количествени данни за захари в мед от разнообразен растителен и географски произход показват множество прилики в захарния профил на испански, италиански и български мед, вероятно поради сходни климатични зони, релеф и растителност. Установяването на потенциални съединения за разграничаване на меда в зависимост от произхода на нектара/маната и държавата производител при наличие на голямо количество данни налага прилагането на различни хеометрични техники.

2.1.2. Разграничаване на мед по ботанически произход

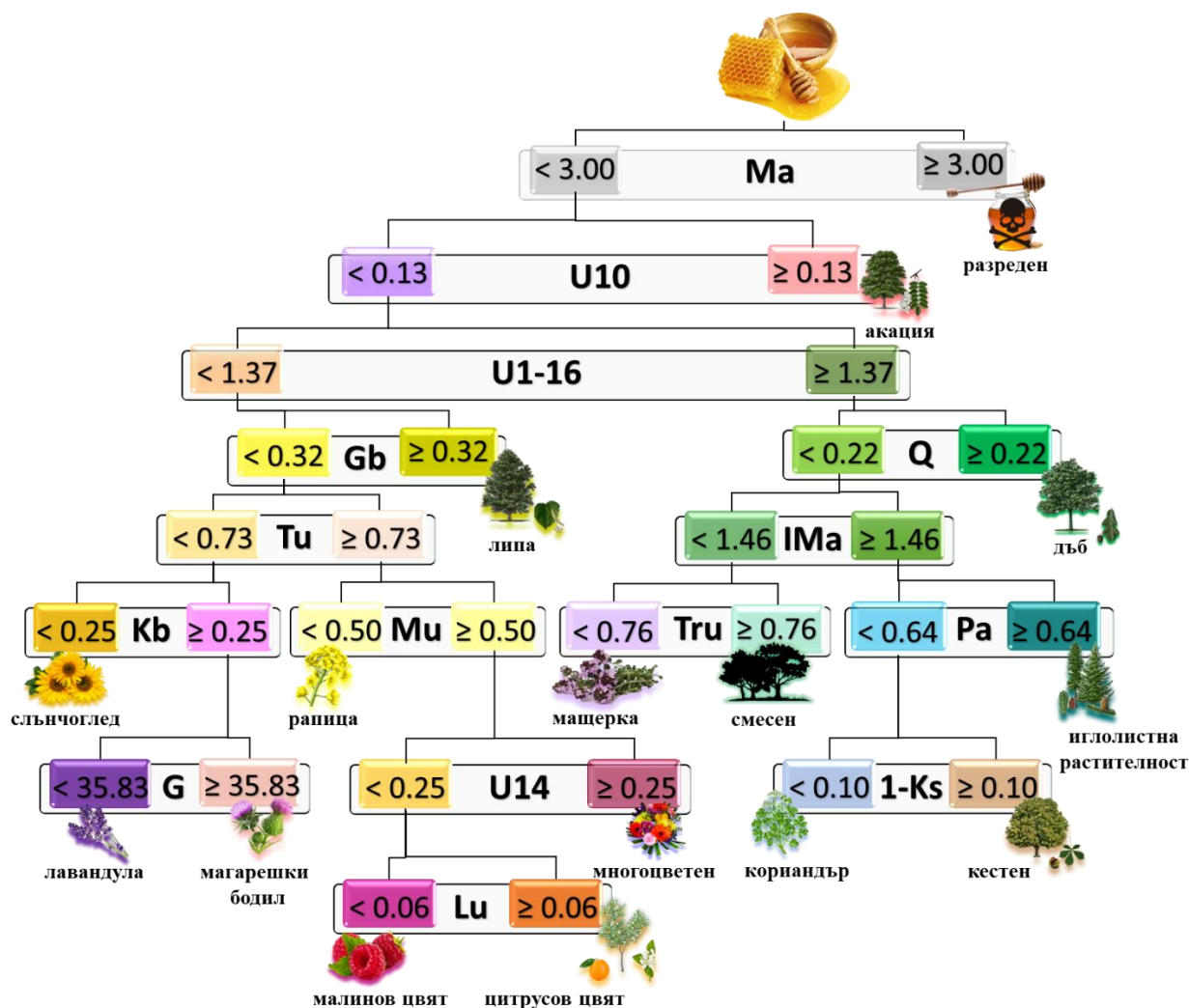
За установяване на статистически значимите компоненти, по чиито количества могат да бъдат разграничени отделните видове мед, приложихме еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA). Данните за 296 проби (без 4 единични проби – *bn*, *евк*, *мч*, *тр*) са разделени в 16 групи, като е извършена проверка за зависимост между вида мед и концентрацията на 41 компонента, както и сумата от неидентифицирани вещества (*U1-U16*). Сравнение на получените оценки за влиянието на отделните компоненти с табличната стойност за критерия на Фишер показва, че количествата на 35 компонента (без *Mz*, *Su*, *U6*, *U7*, *U8*, *U12*, *U15*) се различават съществено в отделните видове мед. Количествените данни на тези 35 вещества (без *ααTr*, която е с нисък критерий на Фишер), както и данни за количеството на малтотетраоза и изопаноза са използвани за изготвяне на PLS-DA анализ. На анализ подложихме общо 299 проби, от които 296 проби, разделени в 16 класа, както и три единични проби, образуващи отделни групи – *евк*, *мч*, *тр*. Пробите са разделени според растителния източник на нектара и/или маната, от който е произведен медът. Двумерна графика на резултатите от PLS-DA е представена на Фигура 43. От нея се вижда добро разграничаване на пробите от отделните класове.



Фигура 43. Графика на резултатите от приложен PLS-DA анализ, включващ 299 проби пчелен мед и сиропи, разделени в 19 класа

За определяне на характеристичните компоненти във всеки клас към създадения PLS-DA модел са изготвени приноси на отделните компоненти. Чрез тях се установяват множество прилики в състава на меда от слънчоглед и магарешки бодил, като тези два вида мед съдържат по-високи количества глюкоза. Пробите от двата класа се различават по количеството на неидентифициран компонент *U9*. Мед от рапица, цитрусов цвят и лавандула също е богат на глюкоза - над 33.5 г/100г, но съдържа в себе си и високи стойности на фруктоза – над 37.5 г/100г. В състава на мед от лавандула се наблюдава и неидентифициран компонент *U5*, а в мед от цитрусов цвят – *U3*, *U9*, *U13* и мезо-2,3-бутандиол, като последният се открива в манов мед от кестен и дъб, както и в мед от остров Питкърн (тропически мед). Приносът на отделните компоненти показва високо съдържание на глюкоза, малтоза и малтотриоза като характерни захари за разреден мед и различни захарни сиропи. В останалите нектарни видове мед също се наблюдава висока концентрация на фруктоза, като освен нея приносът на отделните компоненти потвърждава установения маркер за липов мед – гентиобиоза, който се открива и в тропически мед. Медът от малинов цвят се характеризира с повече пролин, а многоцветният мед – с коджибиоза и неидентифицираното вещество *U10*. По-високо съдържание на ди- и тризахариди в нектарен мед се открива в мед от акация и мащерка, като за акациев мед е характерно наличието на голямо количество тураноза, ерлоза и неидентифициран компонент *U10*. Теглата на компонентите показват, че в мед от мащерка се съдържа и тризахаридите изокестоза, откривана предимно в дъбов мед, и паноза – в мед от иглолистна растителност и евкалипт. Профилът на мед от кориандър е много сходен с профила на всички изследвани видове манов мед – високо съдържание на неидентифицирани вещества, ди- и тризахариди, което вероятно е свързано с наличие на мана по кориандъра и събирането ѝ при производство на този вид мед. В състава на смесен вид мед влизат ди- и тризахари, но с по-ниска концентрация в сравнение с тази в мановите видове мед. Фруктозата, подобно на повечето анализирани нектарни видове мед е в по-високо количество в смесен мед. Количествените данни потвърждават установения от *Simova и съавтори* маркер за дъбов мед – кверцитол,¹⁷ като освен него характеристични са изокестоза и двете идентифицирани форми на 2,3-бутандиол. В мед от иглолистна растителност, както и в мед от кестен и кориандър се наблюдават по-високи количества изомалтулоза, коджибиоза и трехалулоза. Паноза е характеристична за мед от иглолистна растителност, като тя се открива и в мед от евкалипт. От теглата на компонентите в състава на евкалиптов мед се отличава и наличието на кверцитол, който е описан в литературата, като биомаркер за евкалипт, и неидентифицирано вещество *U13*. Мед от мурсалски чай съдържа изопаноза и малтотетраоза, които не са установени в други от анализираните видове мед.

Чрез **CHAID** (*CHi-square Automatic Interaction Detection*) алгоритъм е изготвено дърво на решенията за 296 проби, принадлежащи към 16 класа. Дървото позволява бързо идентифициране на нова проба, без необходимост от допълнително прилагане на хеометрични методи. Информацията от него е илюстрирана на Фигура 46. Дървото на решенията е представено в Приложение 1.

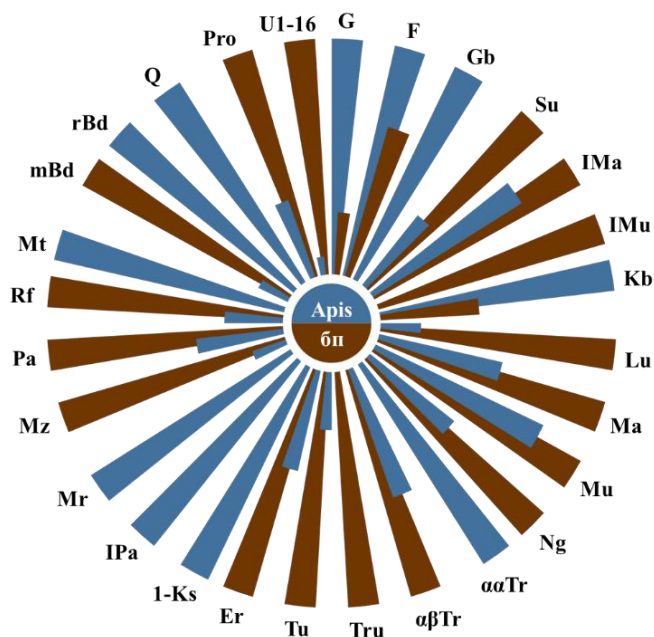


Фигура 46. Информация от дърво на решенията, разграничаващо проби от 16 ботанически вида мед

Фигурата показва, че в дървото на решението са използвани 15 от статистически значимите вещества, установени от дисперсионния анализ (*U1-16*, *Mu*, *Tu*, *IMa*, *Tru*, *Kb*, *Q*, *Ma*, *1-Ks*, *Gb*, *G*, *Pa*, *U10*, *U14*, *Lu*). Чрез дървото са класифицирани вярно 293 от 296 проби, като неправилно групирани проби са *см24*, представляваща смесен мед от евкалипт и многоцветен мед, *мн37* – класифицирана като мед от рапица и *км1* – определена като мед от кориандър.

2.1.3. Разграничаване на мед по ентомологичен произход

Единствената проба мед, която не е включена в изготвения PLS-DA модел, поради големи разлики в състава ѝ в сравнение със състава на мед от европейски пчели (*Apis mellifera*), е проба мед от безжилни пчели (*Meliponini*) – *бп*. Захарният им профил е сравнен посредством диаграма на *Nightingale*, представена на Фигура 47.¹⁸ В проба *бп* е установено високо съдържание на трехалулоза – 20.87 г/100г, което потвърждава литературните данни за използването ѝ като потенциален маркер за мед от безжилни пчели. В меда от европейски медоносни пчели се открива по-голямо количество глюкоза, фруктоза, коджибиоза, αα-трехалоза, както и маркерите за различни ботанически видове мед – гентиобиоза, изокестоза, изопаноза, малтотриоза, малтотетраоза, (R*S*) 2,3-бутандиол и кверцитол.

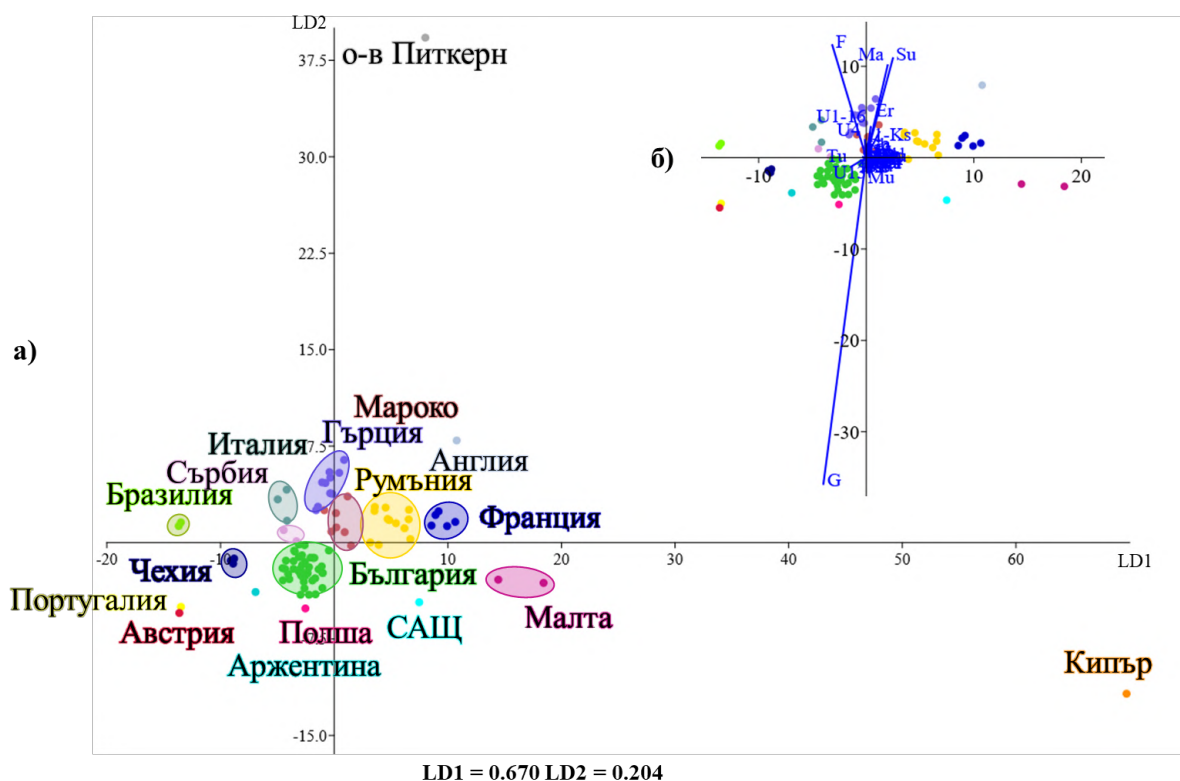


Фигура 47. Диаграма на *Nightingale*, показваща разликите между мед от европейски (*Apis*) и от безжилни пчели (*bn*)

Сравнени са и захарните профили на мед от различни ендемични видове европейски пчели – български вид *Apis mellifera rodopica* и малтийски *Apis mellifera ruttneri*. В състава им се забелязват малки разлики в количествата на маркерите за различните по вид мед, като гентиобиоза, изокестоза, кверцитол, мезо-2,3-бутандиол и паноза, вероятно поради различия в растителния произход на изследваните многоцветни проби мед. Мелецитоза, която не е статистически значима за разграничаване на меда по ботанически източник, е с по-високо съдържание в мед от малтийски пчели. Откроява се еднаква концентрация на сумата от неидентифицирани вещества *U1-U16* – 1.27 г/100 г за двете групи мед, както и разлики до 10% за фруктоза – 37.74 и 41.43 г/100 г, изомалтоза 0.67 и 0.63 г/100 г, и тураноза 1.12 и 1.16 г/100 г. Необходими са изследвания върху по-голям брой проби за потвърждаване на установените от нас разлики в мед от двата ендемични вида пчели.

2.1.4. Разграничаване на мед по географски произход

С цел различаване на анализираните проби по географски произход извършихме линейен дискриминантен анализ (LDA), като първоначално отделихме нектарните проби мед от мановите. Поради големия брой проби български нектарен мед (124) избрахме на случаен принцип 45 проби, като общият брой нектарни проби е сведен до 100, разделени в 18 класа, спрямо страната на произход. Двумерна графика на резултатите е представена на Фигура 49а, а биплот – на Фигура 49б.

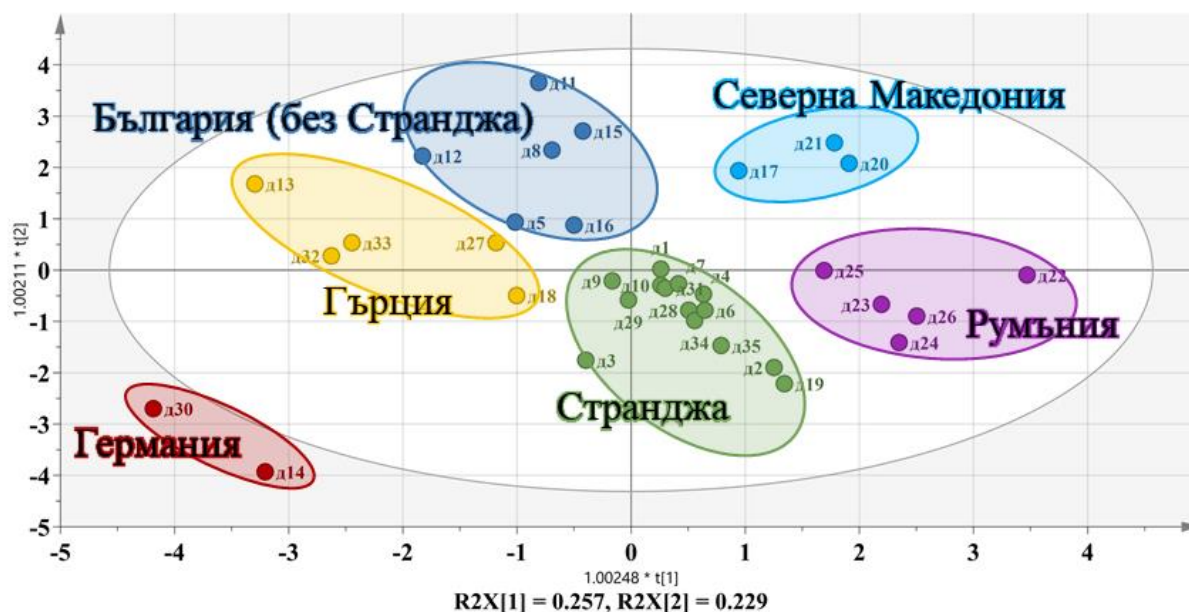


Фигура 49. а) Графика на резултатите за 100 проби нектарен мед; б) Биплот

От графиката на резултатите (Фигура 49а) се наблюдава голяма разлика в състава на меда от Кипър (*цит1*) и от остров Питкърн (*тр*). Пробите от България, Сърбия, Италия и Полша са близки по състав, както и тези от Гърция и Мароко, Португалия и Австрия. Биплотът (Фигура 49б) показва по-високо съдържание на глюкоза в мед от Полша, САЩ, България и Австрия. Медът от о-в Питкърн, Франция, Англия и Румъния е богат на захароза и малтоза, а този от Мароко съдържа повече фруктоза. Точността на модела чрез матрица на класификацията е 99%.

Аналогичен подход използвахме и за мановия мед. За дискриминантен анализ са използвани всички 100 проби мед, класифицирани в 13 групи спрямо страната на произход. Биплотът показва по-високо съдържание на мелецитоза в немски, паноза – в гръцки, а фруктоза – в македонски проби мед. Матрицата на класификацията показва точност от 99% за изготвения модел.

За определяне на веществата, по чието количество е възможно разграничаване на български манов мед със ЗНП – Странджански дъбов манов мед, от друг дъбов манов мед е извършен ортогонален линейен дискриминантен анализ по метода на частичните най-малки квадрати. За създаване на модела използвахме единствено проби мед от дъб (*д1-д35*). Те са разделени в 6 групи, спрямо географския им произход, като медът от България е разделен на 2 класа – от Странджа и България без Странджа. Количествата на всички установени вещества са използвани в анализа, като чрез VIP параметър броят на значимите компоненти е намален до 12 – *G, F, Kb, Ma, aaTr, Er, Mz, Q, Pro, U3, U6* и *U1-U16*. Количествата на изокестоза и 2,3-бутандиол, предложени за маркери за дъбов манов мед не позволяват различаване на пробите от отделните държави. Двумерна графика на резултатите е представена на Фигура 51.

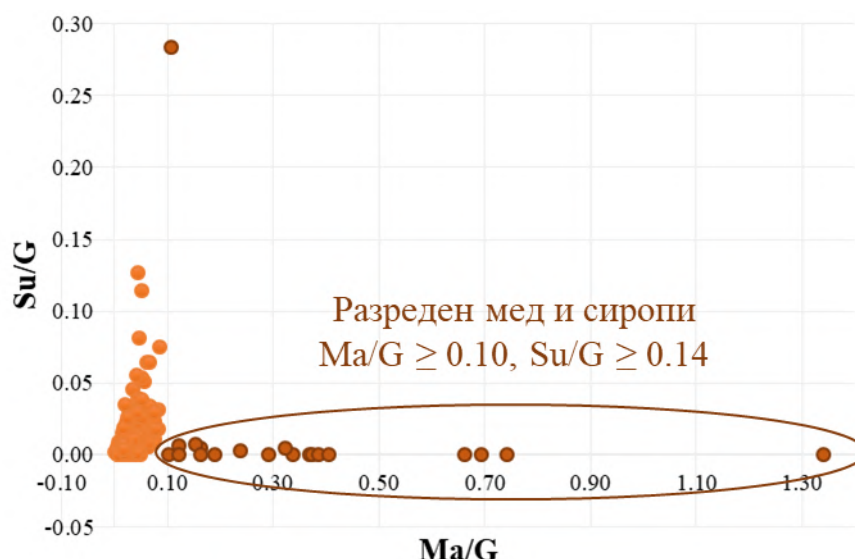


Фигура 51. Двумерна графика на резултатите, получена чрез OPLS-DA анализ за разграничаване на дъбов манов мед от различни области и държави

Медът от Германия се отличава силно от останалите проби по високото количество на описания в литературата характерен за манов мед тризахарид мелецитоза, както и по съдържанието на $\alpha\alpha$ -трехалоза. Еднаквият ботанически източник на меда и голямата разликата в неговия състав доказват, че произходът му зависи главно от вида на листните въшки, произвеждащи маната, и по малко от растението. Гръцкият дъбов мед се отличава с по-високи количества ерлоза и малтоза, македонският – с повече коджибиоза, а румънският съдържа много фруктоза. За странджанския дъбов манов мед е характерно наличието на по-голямо количество глюкоза, а в българския мед от области извън Странджа се откриват по-високи концентрации на пролин и на неидентифицираните вещества. Установеният маркер за дъбов мед – кверцитол е с по-високо съдържание в меда от Северна Македония, Румъния и от областите на България, извън Странджа. Възможността за предсказване на географския произход на дъбов мед чрез създадения модел е представена чрез матрица на класификацията и показва точност от 100%, като валидирането на модела извършихме чрез пермутационен тест с 100 пермутации.

2.1.5. Различаване на истински мед от разреден мед и сиропи

Резултатите от количествено определяне на захариди в захарни сиропи показва съществена разлика в състава на често срещаните подсладители и чистия пчелен мед, като основен маркер за клас *pp* е малтоза и образуващата се от нея малтотриоза. В редки случаи за разреждане на пчелен мед се използва захароза (*pp12*). Количествените данни от ^{13}C спектри показват, че в изследваните проби подправен мед съотношението на малтоза към глюкоза *Ma/G* е от 0.10 до 1.37, а съотношението на захароза към глюкоза *Su/G* в проба *pp12* е 0.28, докато стандартната ѝ стойност не надвишава 0.13. Фигура 53 представя резултатите от двете съотношения в анализиранияте 300 проби, като установяването на тези стойности позволява надеждно откриване на разреден мед.



Фигура 53. Стойности за съотношенията Ma/G и Su/G , получени от 300 въглеродни ЯМР спектри

По-бързо идентифициране на разреден мед може да бъде установено измервайки 1H ЯМР спектър с една акумулация без потискане сигнала на водата без регистрация на ^{13}C ЯМР спектър. В него се наблюдават неприпокрити сигнали и за трите захарида – 3.27 м.ч. за β -малтоза, 4.20 м.ч. за захароза и 3.23 м.ч. за β -глюкоза, като съотношенията Ma/G и Su/G могат да бъдат определени чрез деконволюция, височина на сигналите или чрез интегриране. Предложеният метод за идентифициране на разреден мед, основаващ се на Ma/G и Su/G дава по-надеждни и бързи резултати от предложените в литературата съотношения Ma/Ima , Ma/Tu и Su/Tu ,¹⁹ като времето, необходимо за регистриране на такива спектри е под 10 секунди.

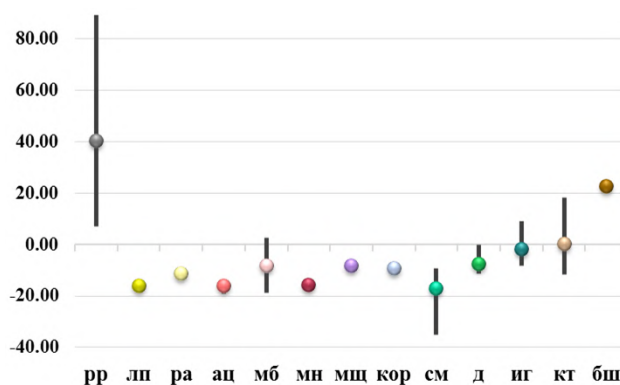
2.1.6. Оптичен ъгъл на пчелен мед

Един от по-рядко използваните аналитични методи, прилагани за разграничаване на манов от нектарен мед в някои европейски държави е измерването на оптичен ъгъл на въртене. Методът не е утвърден за класифициране на български мед.

а) Измерване специфичен ъгъл на въртене на мед и сладко

Утвърдената методология за определяне на оптичен ъгъл на мед включва сложна пробоподготовка – разтваряне на пчелен мед/сладко във вода, последователно добавяне на разтвори Карез I и Карез II, филтруване и престой от 24 ч. Приложихме я за измерване на оптичен ъгъл на въртене на 41 проби мед с различен ботанически и географски произход и 1 проба сладко от борови шишарки (*биш*).

За по-ясно сравнение на стойностите на отделните видове мед и сладко, данните са представени графично на Фигура 55.



Фигура 55. Големина на специфичен ъгъл на въртене при различни видове мед (разреден (рр), от липа (лп), рапица (ра), акация (ац), магарешки бодил (мб), многоцветен (мн), мащерка (мщ), кориандър (кор), смесен (см), дъб (д), иглолистна растителност (иг), кестен(кт)) и сладко от борови шишарки (бш)

Получените отрицателни стойности за големина на ъгъла на нектарните видове мед съответстват на литературните данни, независимо от точния растителен и географски произход. Големи разлики се регистрират при пробите манов мед, които в някои литературни източници се характеризират с положителен специфичен ъгъл. Възможни причини за наблюдаваната разлика е наличието на различни по вид смучещи насекоми, произвеждащи мана, неточности в изследванията и/или анализи на разреден мед, който също притежава положителна стойност на ъгъла.

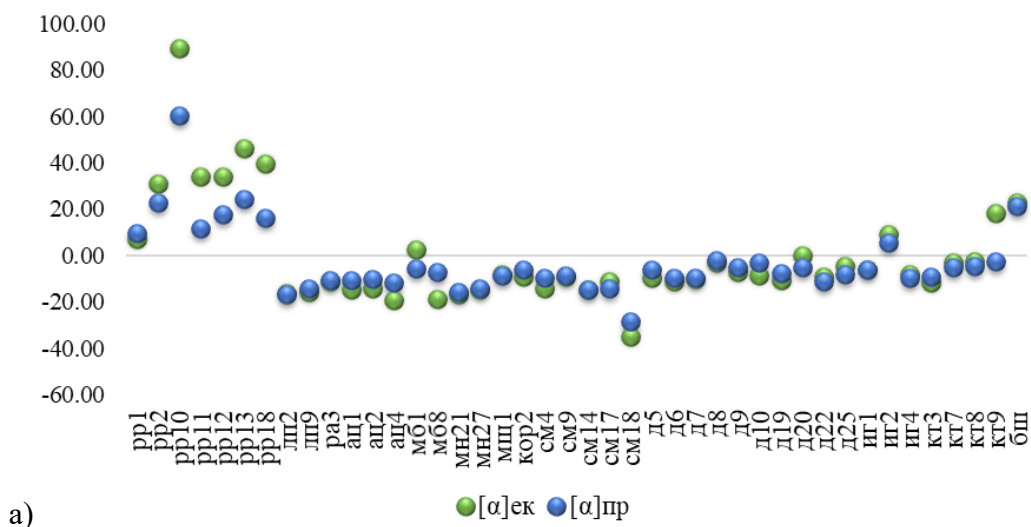
От данните ясно се вижда, че чрез измерване специфичен ъгъл на въртене не е възможно разграничаването на мед по ботанически произход. Разреден мед, притежаващ стойности $[\alpha]_D^{20}$ от +7.2 до +89.2 може да бъде различен от нектарен/смесен, имащ $[\alpha]_D^{20}$ от -35.2 до +2.5. Причина за сходствата между различните видове е подобен захарен профил, като за установяване на компонентите, влияещи върху големината на ъгъла приложихме корелационен анализ. В него са сравнени количествените данни за всички идентифицирани захариди, определени от ^{13}C ЯМР спектрите със специфичния ъгъл на въртене за анализирани 42 проби. Данните стандартизирахме чрез z-трансформация. Коефициентът на корелация на *Pearson* (*r*) показва наличието на висока линейна зависимост между специфичния ъгъл на въртене и съдържанието на малтоза, малтотриоза и фруктоза, като силна отрицателна взаимовръзка съществува единствено между количеството фруктоза и големината на ъгъла.

б) Метод за изчисление на оптичен ъгъл на въртене на мед и сладко

Въз основата на установените зависимости между големината на ъгъла и съдържанието на захариди, в настоящото изследване разработихме метод за изчисляване на специфичен ъгъл на въртене на мед или сладко. Методът използва концентрациите на 21 идентифицирани захарида, определени от ^{13}C ЯМР спектрите на отделните проби мед и $[\alpha]_D^{20}$ стойностите им, представени в Приложение 6. Формулата, чрез която е възможно пресмятането на специфичен ъгъл на мед или сладко $[\alpha]_{\text{мед}}$ е представена по-долу, като $\%_{\text{зах}}$ и $[\alpha]_{\text{зах}}$ са концентрацията и специфичният оптичен ъгъл за отделните захариди.

$$[\alpha]_{\text{мед}} = \sum_{n=21} \left(\frac{\%_{\text{зах}(1)} \times [\alpha]_{\text{зах}(1)}}{100} \right) + \dots + \left(\frac{\%_{\text{зах}(n)} \times [\alpha]_{\text{зах}(n)}}{100} \right)$$

По формулата са изчислени ъглите на анализираниите 41 проби мед и 1 проба сладко, след което те са сравнени с опитно установените. Пресметнатите $[\alpha]_{\text{пр}}$ и експерименталните $[\alpha]_{\text{ек}}$ стойности са представени на Фигура 56.



Фигура 56. а) Пресметнати $[\alpha]_{\text{пр}}$ и експериментални $[\alpha]_{\text{ек}}$ стойности за специфичен ъгъл на 41 проби мед и една проба сладко.

Наблюдава се високо ниво на сходство между теоретично пресметнатите и експериментално установените ъгли. Наблюдават се и някои разлики, които са различни при отделните видове мед. Разликата между $[\alpha]_{\text{ек}}$ и $[\alpha]_{\text{пр}}$ е от 3 до 11% в мед от липа, рапица, мащерка и многоцветен мед. При пробата сладко с напълно установен захарен профил, разликата в стойностите на двата ъгла е 1.4 (6%), а при концентрация на неидентифицирани вещества над 1.37 г/100 г разликата достига над 23%.

Разработеният метод позволява добра точност за пресмятане на специфичен ъгъл при напълно установен захарен профил. Разликите между изчислените и експерименталните ъгли за някои видове мед могат да се обяснят с наличие на други неустановени хирални съединения с висок ъгъл на въртене. Необходими са допълнителни анализи за постигане на по-висока точност на метода, които да открият статистически значимите неидентифицирани компоненти, особено в манови видове мед от дъб и кестен.

2.2. Вино

Виното, подобно на пчелния мед, е едно от десетте най-често фалшифицирани хранителни продукти в света. Доказване на неговата автентичност изисква множество процедури, включващи идентифициране и количествено определяне на съдържащите се във виното вещества, създаване на надеждна база данни за различаване на вина, произведени от отделни сортове грозде, както и възможности за бързо разграничаване на истинско от разрежено вино. С цел доказване на качеството и спецификата на вина от местни типично български сортове грозде, освен изброените по-горе дейности е необходимо и определяне на компонентите, по които традиционните български вина се отличават от вина, произведени от широко разпространените международни сортове грозде, както и възможност за различаване на бели и червени вина, произвеждани в двете Защитени Географски Указания (ЗГУ) в България – Дунавска равнина и Тракийска низина.

2.2.1. Качествен и количествен състав на органични компоненти във вино

Анализ на вино се извършва повече от един век, като продължава разработването на все по-бързи и надеждни методи за неговия контрол и за определяне на неговата автентичност. Едва от 26-ти ноември 2020 г. на 18-тата Генерална асамблея на Международната организация по лозата и виното (OIV) е взето решение ¹H ЯМР спектроскопия да е сред официалните методи за качествено и количествено определяне на определен брой вещества във виното – глюкоза, оцетна, сорбинова, фумарова, шикимова и ябълчена киселини.²⁰

Използвахме идентични условия на описаните от OIV (pH, T, съотношение на вино към буфер) за приготвяне на 70 проби вино, като регистрирахме техни едномерни и двумерни спектри.

За определяне на оптималната поредица с потискане сигнала на водата са регистрирани ¹H спектри получени при често срещаните експериментални техники – *zgcprr*, *noesygppr1d*, *noesypr1d* и *zg0pr*. Спектрите, регистрирани с импулсни поредици *zgcprr*, *noesypr1d* и *zg0pr* не се различават помежду си, като в тях се наблюдават малко по-високи интензивности за сигналите на киселини. В настоящата дисертация, за анализ на пробите приложихме *zg0pr* експерименти, като определихме еднозначно 38 компонента. Надеждното им идентифициране е потвърдено чрез двумерни експерименти (JRES, TOCSY, HSQC) и чрез литературни данни, а количественото им определяне извършихме чрез интегриране на сигналите по формулата, приложена в изследването на Godelmann²¹:

$$m_x = \frac{N_{TSP} * Int_x * M_x * m_{TSP}}{N_x * Int_{TSP} * M_{TSP}},$$

където N_{TSP} и N_x са съответно броят протони от интегрирания сигнал на стандарта и на анализираното съединение; Int_x и Int_{TSP} са площите на сигналите на анализа и TSP; M_x и M_{TSP} са моларните маси на анализираното вещество и стандарта (172.27 г/мол); а m_{TSP} е масата на TSP.

По този метод са установени количествата на 31 вещества: 8 алкохола (мезо-2,3-бутандиол, глицерол, изобутанол, изопентанол, мио-инозитол, метанол, 1-пропанол, 2-фенилетанол), 8 органични киселини (винена, галактуронова, лимонена, млечна, мравчена, шикимова, ябълчена, янтарна), 3 аминокиселини (аланин, пролин, тирозин), 5

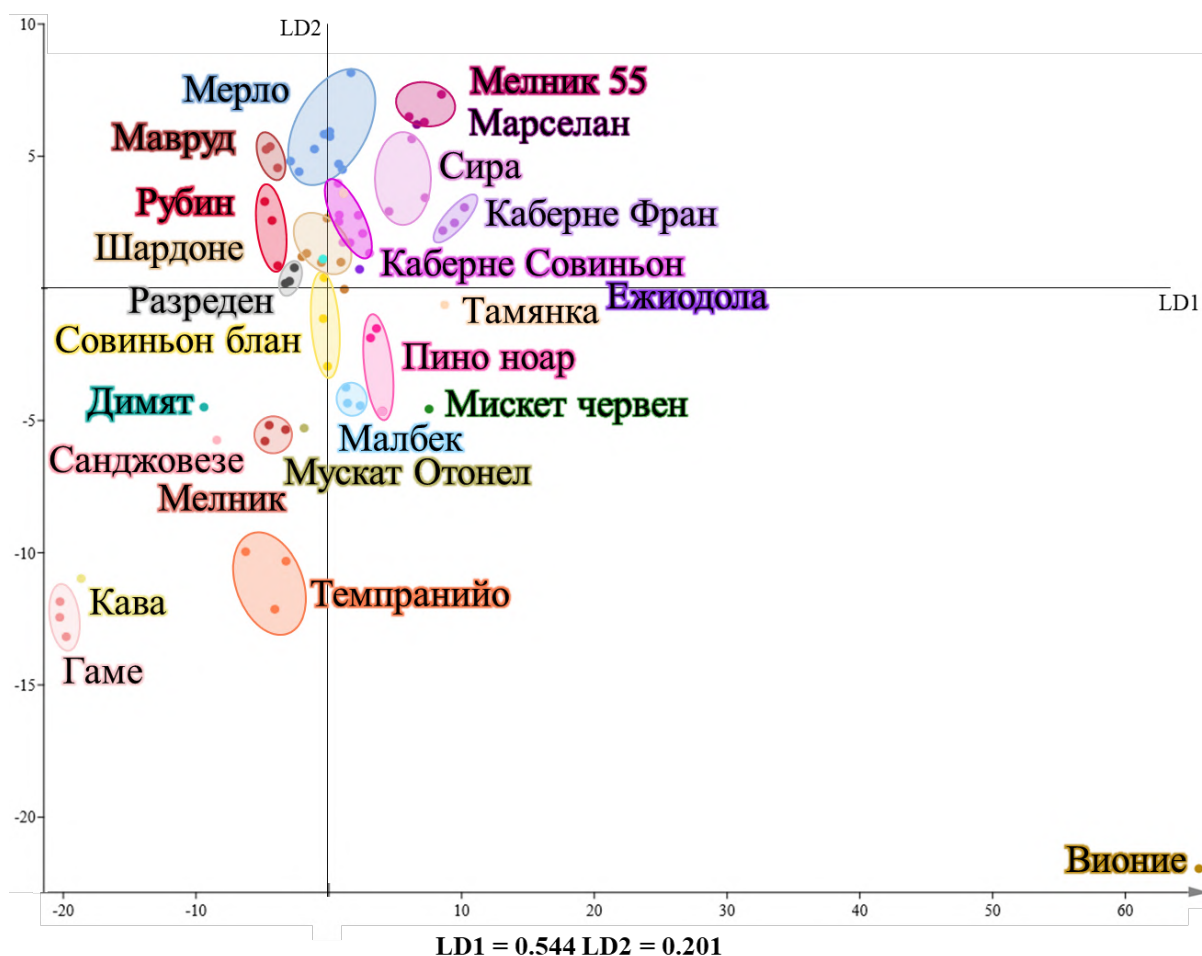
захарида (арабиноза, галактоза, глюкоза, фруктоза, захароза), 3 фенолни съединения (кафеена, кафтарова и кутарова киселини), ацеталдехид, ацетоин, холин и тригонелин, определени в мг/л. Количествата етанол, оцетна и галова киселини не са определени поради припокриване на сигналите им. Кверцитол и валин са установени като следи и количественото им измерване не е надеждно. В анализиранияте проби не са открити 5-ХМФ и сорбинова киселина.

При сравнение на количествените данни на вината спрямо техния вид, в разредените вина се наблюдават по-ниски концентрации на множество от компонентите, сред които мезо-2,3-бутандиол, глицерол, изобутанол, изопентанол, метанол, миоинозитол, 1-пропанол, винена, галактуронова и янтарна киселини, пролин, тирозин, захароза, тригонелин и холин. Често срещаните съединения във виното като галактоза, шикимова, кафеена, кафтарова и кутарова киселини не са установени в нито една от разредените проби. Количествените данни за отделните видове вина обикновено не са достатъчно различни, за да позволяват откриване на потенциални маркери, но се забелязват разлики в количествата на някои киселини, като млечна киселина, която е в по-високото съдържание в червените сортове, особено в Малбек и Темпранийо ($LA > 2117$ мг/л), вероятно поради по-пълно протичане на ябълчено-млечнокисела ферментация. Ябълчена киселина е установена в по-големи концентрации в бели видове вина – Шардоне и Совиньон блан и във вина от сорта Мелник – $MalA > 341$ мг/л, а високо съдържание на винена киселина се наблюдава в млади вина от сорт Гаме от регион Божоле, Франция – $TA > 4177$ мг/л. Сравнение на наличните в литературата данни с данни от извършения от нас количествен анализ показва прилики в съдържанието на някои вещества (предимно аланин, 1-пропанол, 2-фенилетанол), както и разлики в част от компонентите, сред които глюкоза и фруктоза, които са зависими от климата. Разликите в концентрациите на повечето киселини (винена, лимонена, млечна, шикимова, ябълчена, янтарна) и други вещества зависят от метода на производство на виното, от отлежаването в дъбови бъчви, от метеорологичните условия и релефа, от възможни неточности при метода на анализ, както и от специфичните изисквания към вкуса от дадена нация. Откриването на компоненти за различаването на вина спрямо сорта грозде и географския произход изисква прилагането на хеометрични методи.

2.2.2. Разграничаване на вина по сорт грозде, използван при производството му

При анализа на количествените данни от 1H ЯМР спектри на вина с различен произход използвахме хеометрични техники, аналогични на приложените при анализа на пчелен мед – дисперсионен и дискриминантен анализ. Еднофакторен дисперсионен анализ приложихме за 61 от пробите (без единичните видове – *тмн, кава, дим, ежи, вио, мар, сан, мис, мо*), като разделихме вината в 15 класа, спрямо сорта грозде, използван при производството им и разредени вина. Установихме, че статистически значими за разграничаване на различните видове вина са количествата на 26 от идентифицираните компоненти (без мравчена киселина, глюкоза, фруктоза, кафеена киселина и ацетоин).

Използвахме линеен дискриминантен анализ (LDA) за разграничаване на 70 проби вино по сорт грозде. Моделът с 4 компонента създадохме от матрицата с данни за 26 статистически значими вещества. Двумерна графика на резултатите е представена на Фигура 62.



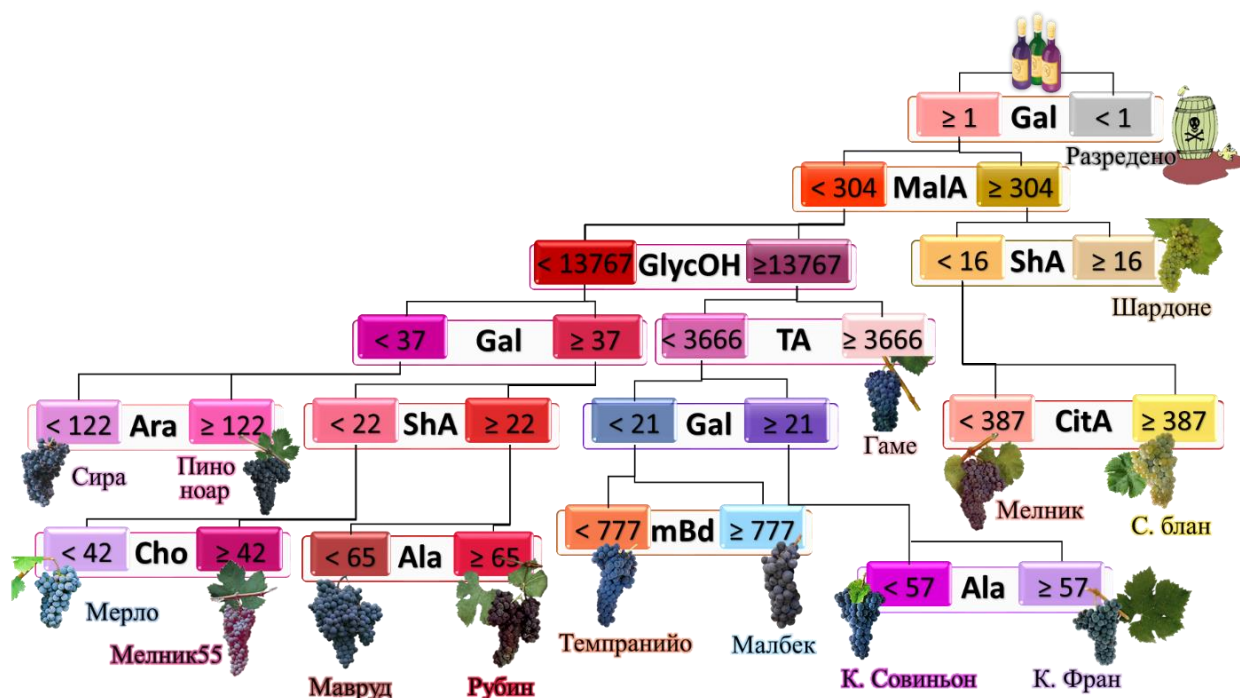
Фигура 62. Двумерна графика на резултатите от приложен LDA анализ, целящ разграничаване на пробите вино по използван сорт грозде

Фигурата показва добро различаване на отделните видове вино и възможност за групиране на пробите. Виното от сорт Вионие се отличава от всички останали. Разликата се дължи основно на по-високото съдържание на изобутанол – 373 мг/л, което е над 3 пъти повече в сравнение с максималното количество в останалите видове вина – 130 мг/л и средна стойност – 51 мг/л. Разграничаване по цвета на вината не е възможно, а изследваните розе и синьо вино се групира към съответните сортове.

От приложените хеометрични техники установихме, че разредените вина наподобяват белите вина по своя профил – съдържат в себе си високи количества ябълчена и лимонена киселини. В почти всички вина от бял сорт грозде, с изключение на Мускат Отонел, се забелязва високо съдържание на ябълчена (над 564 мг/л) и лимонена киселини (над 232 мг/л), като само във вината от вид Шардоне и Тамянка лимонената киселина е повече от ябълчената. Последните се различават помежду си по концентрацията на 1-пропанол, която е в по-високо количество в Шардоне. 1-Пропанол е в голямо количество и в Совиньон блан, Димят, Мискет червен, Вионие и Кава. Характерно за виното от сорт Кава е високо съдържание на млечна (2214 мг/л) и винена (3923 мг/л) киселини, а за виното от сорт Вионие – по-голямо количество висши алкохоли (*mBd*, *iBuOH*, *iPentOH*, *1PrOH*), захарен алкохол (*myoIn*) и ацеталдехид. Профилът на белите вина от типичните български сортове грозде – Димят и Мискет червен се отличава с висока концентрация на захариди (*Su*, *Gal*), кафтарова киселина и тригонелин, като пробата *дим* се отличава от *мис* по по-високото съдържание на

алкохоли (*iPentOH*, *2PhEt*) и винена киселина, както и по по-ниската концентрация на арабиноза, холин и изобутанол. Наличие на ябълчена киселина над 340 мг/л е характерно само за два червени вида вино – Широка мелнишка лоза и Санджовезе, както и за розе от Каберне Совиньон. Във вино от сорт Санджовезе се съдържа голямо количество лимонена (738 мг/л), както и винена киселина (над 4177 мг/л), като последната е характерна за вината Гаме. Сорт Гаме включва в състава си високи концентрации на фенолни киселини (кафтарова и кутарова), както и на шикимова киселина, които се срещат в значителни количества в много от червените видове вино – Мавруд, Сира, Каберне Совиньон, Каберне Фран и Марселан. Профилът на Сира наподобява този на Марселан по съдържанието на метанол и ацеталдехид, които заедно се срещат в голямо количество и в проби *кф1-кф3*. Разликата между вина от Сира и Марселан е в количеството аланин и пролин, като тези аминокиселини освен в Марселан са установени във високи концентрации и в Рубин и Каберне Фран. Съдържанието на компонентите в Каберне Фран наподобява на това в Каберне Совиньон, освен концентрациите на мезо-2,3-бутандиол, аланин, ацеталдехид и захароза, които са по-високи в Каберне Фран и по по-големи количества холин и мио-инозитол в Каберне Совиньон. Високи концентрации за холин и мио-инозитол се наблюдават и в Рубин. Във вината от повечето български червени сортове грозде (Рубин, Мелник-55, Мавруд), както и в Мерло се измерва високо съдържание на галактоза. Вината Мавруд съдържат по-голямо количество шикимова киселина и тирозин от Мерло и Мелник 55, докато характерна за Мерло е арабиноза, а за Мелник-55 – мезо-2,3-бутандиол и холин. Проби *млб1-млб3* също съдържат високи концентрации на холин и мезо-2,3-бутандиол, както и на млечна киселина (над 2117 мг/л) и глицерол (над 17445 мг/л), характерни за вината Темпранийо. Теглата на компонентите за вината Темпранийо и Пино ноар показват високо съдържание на изобутанол, холин и тригонелин, като в *пн1-пн3* са установени повече 1-пропанол и кутарова киселина, които са характерни, заедно с ацеталдехид и за Ежиодола. Използваният модел чрез матрица на класификацията е с точност от 98.57%.

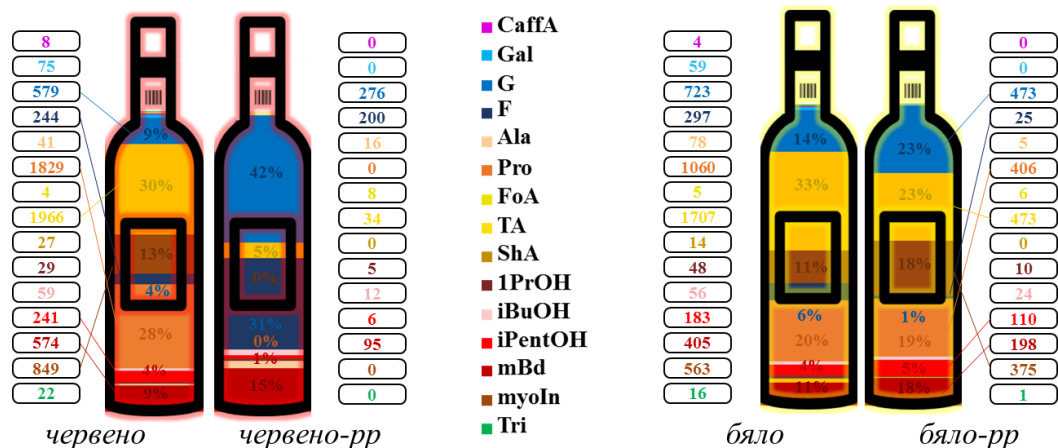
Количествените данни за 61 от пробите, разделени в 15 класа са използвани в дърво на решенията, изготвено чрез *CHAID* алгоритъм. Използваните мерни единици са мг/л, а единичните проби са изключени. Дървото е представено в Приложение 7, а обобщената информация от него – на Фигура64. Десет са компонентите по чието количество може да бъде определен сортът на използваното за производство грозде – монозахариди (*Gal*, *Ara*), органични киселини (*TA*, *MalA*, *CitA*, *ShA*), алкохоли (*mBd*, *GlycOH*), аланин и холин. Дървото потвърждава характерната за бели вина и за вина от Широка мелнишка лоза по-висока концентрация на ябълчена киселина. По-голямо количество глицерол се наблюдава във вина от сортовете Каберне, Темпранийо, Малбек и Гаме, а повече галактоза в типично българските видове вина и в Мерло. Дървото на решенията позволява точно идентифициране на вида на виното, като чрез съставения алгоритъм е възможно определяне на сорта грозде, използван за синьо вино, но не и за розе. Проба *ксб* е единствената неправилно класифицирана проба, която е предвидена като Шардоне.



Фигура 64. Обобщена информация от дърво на решенията, позволяващо разграничаване на едносортни вина, произведени от 15 различни вида грозде

2.2.3. Различаване на истинско от разредено вино

С цел определяне на основните компоненти, чрез които е възможно различаване на истинско от разредено вино е извършен линеен дискриминантен анализ по метода на частичните най-малки квадрати. За анализ са използвани средните стойности на червените (обозначени като *червено*), белите (*бяло*), разредените червени (*червено-pp*) и разреденото бяло вино (*бяло-pp*), като четирите проби са групирани в два класа – истински и разредени. Чрез VIP параметър за модела са установени 15 вещества, значими за разграничаване на двете групи вино – *mBd*, *iBuOH*, *iPentOH*, *myoIn*, *1PrOH*, *TA*, *FoA*, *ShA*, *Ala*, *Pro*, *Gal*, *G*, *F*, *CaffA* и *Tri*. Сравнение на количествата на тези компоненти спрямо цвета и качеството на виното е представено на Фигура 66. На фигурата са представени и процентните съдържания на основните компоненти (*G*, *TA*, *myoIn*, *F*, *Pro*, *iPentOH*, *mBd*), определени спрямо общото количество на петнадесетте вещества.



Фигура 66. Количества (мг/л) на 15 вещества и процентното съдържание на основните 7 от тях в 4 вида вино

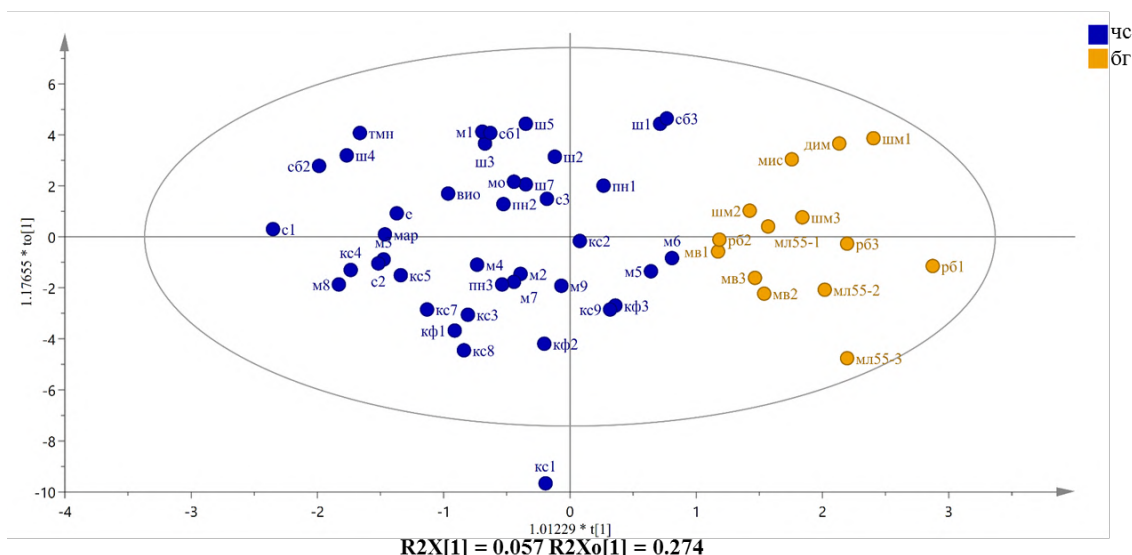
В разредените вина количеството на повечето от компонентите (с изключение на мравчена киселина) е по-ниско или веществата напълно отсъстват. На фигурата ясно се вижда голяма разликата между съотношенията на петнадесетте вещества в разреденото червено вино и в останалите вина. В него особено високо е процентното съдържание на глюкоза (42%) и фруктоза (31%), вероятно поради изкуствено добавяне на захар. Малко по-голяма стойност в процентите на някои висши алкохоли (изопентанол, мезо-2,3-бутандиол, мио-инозитол) се наблюдава за *бяло-pp*, но не и за *червено-pp*, което показва разлика в начина на разреждането им. Методът на производство на разредените вина зависи и от цвета на желаните за получаване продукт.

2.2.4. Сравнение на синьо вино и розе. Разграничаване на червено вино с протекла мацерация от червено вино без мацерация

Съдържанието на синьо и бяло вино от сорт Шардоне са сравнени, като са установени някои разлики между тях. Висока концентрация на млечна киселина и малки количества ябълчена киселина, характерни за непротекла напълно ябълчено-млечнокисела ферментация се откриват в състава на синьото вино. Освен това се наблюдава по-ниско съдържание на кафтарова киселина, вероятно поради по-краткотраен престой на ципите с гроздовия сок, както и по-високо наличие на захари, породено от използването на по-зряло грозде (съответно по-топъл климат), изкуствено добавяне на захар към мъстта или непротекла докрай алкохолна ферментация. Установени са и разлики между състава на розе и червено вино от Каберне Совиньон, като при производството на розе не се забелязва протичане на ябълчено-млечнокисела ферментация. По-ниските концентрации на множество компоненти в розе вероятно са резултат от различни производствени процеси, включващи използване единствено на гроздова мъст, но не и на гроздова каша, както и от извършване на по-краткотрайна мацерация. Влиянието на процеса мацерация върху количествата на установените компоненти показва по-високо съдържание на фенолни вещества (*CaftA*, *CoutA*) в произведени чрез мацерация вина, както и по-големи количества от основните захариди (*G*, *F*), органични киселини (*TA*, *GalA*, *CitA*, *MalA*, *SA*), алкохоли (*mBd*, *GlycOH*, *iBuOH*, *myoIn*, *2PhEt*), аминокиселини (*Pro*, *Tyr*), холин и тригонелин. Предполагам източник на тези вещества е гроздовата каша и по-продължителна екстракция на компонентите в мъстта, както и по-пълно протичане на някои ферментационни процеси.

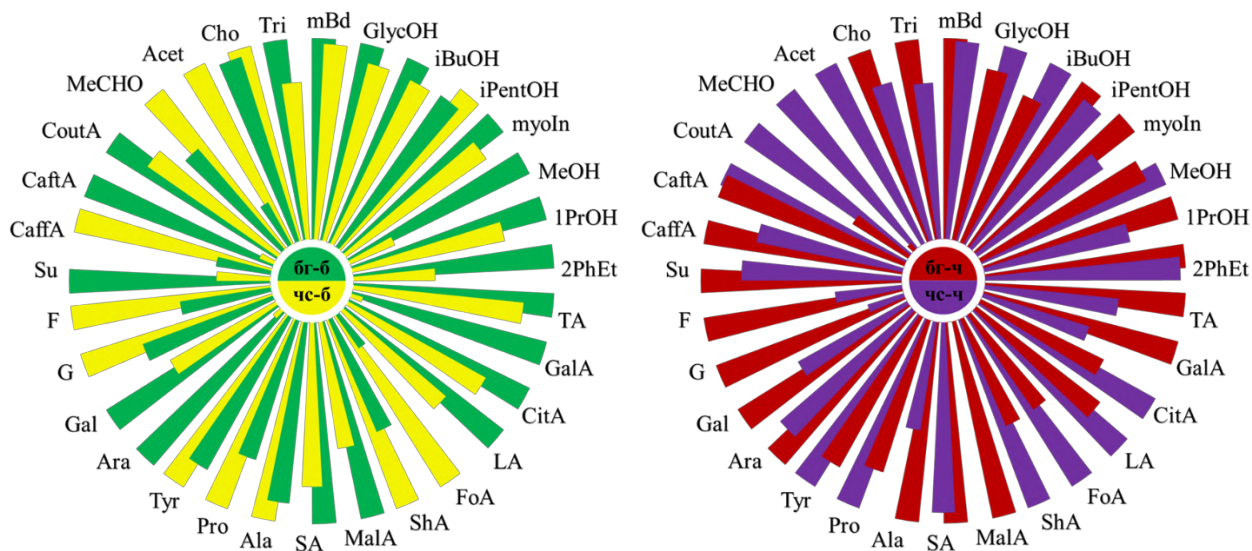
2.2.5. Разграничаване на вино от типично български сортове грозде

Международни експерти оценяват високо стойността на виното от традиционни български сортове, но неговият състав все още е слабо проучен. За разграничаване на вино, произведено в България от местни и от международни сортове грозде, приложихме ортогонален линейен дискриминантен анализ по метода на частичните най-малки квадрати. За анализ са използвани количествени данни за всички установени компоненти в 54 проби бели и червени вина от България. Пробите са разделени в два класа – *бг* (включващ 14 традиционни вина от Мавруд, Мелник, Мелник-55, Рубин, Димят и Мискет червен) и *чс* (включващ 40 вина от Ежиодола, Каберне Совиньон (без розе *ксб*), Каберне Фран, Марселан, Мерло, Пино ноар, Сира, Вионие, Мускат Отонел, Совиньон блан, Тамянка, Шардоне (без синьо вино *шб*)). Графика на резултатите е представена на Фигура 70.



Фигура 70. Двумерна графика на резултатите към приложен OPLS-DA анализ, позволяваща различаване на вино от български (бг) и международен (чс) сорт грозде

На фигурата се вижда ясно разделяне на двете групи, независимо от цвета на виното или техниката му на производство. Разликите между бели и червени вина от български и чуждестранни сортове грозде, произведени в България са представени чрез диаграми на *Nightingale*. За тяхното изготвяне използвахме средните стойности на всички установени вещества в белите български (бг-б) и чуждестранни (чс-б) вина, както и в червените български (бг-ч) и чуждестранни (чс-ч) вина.



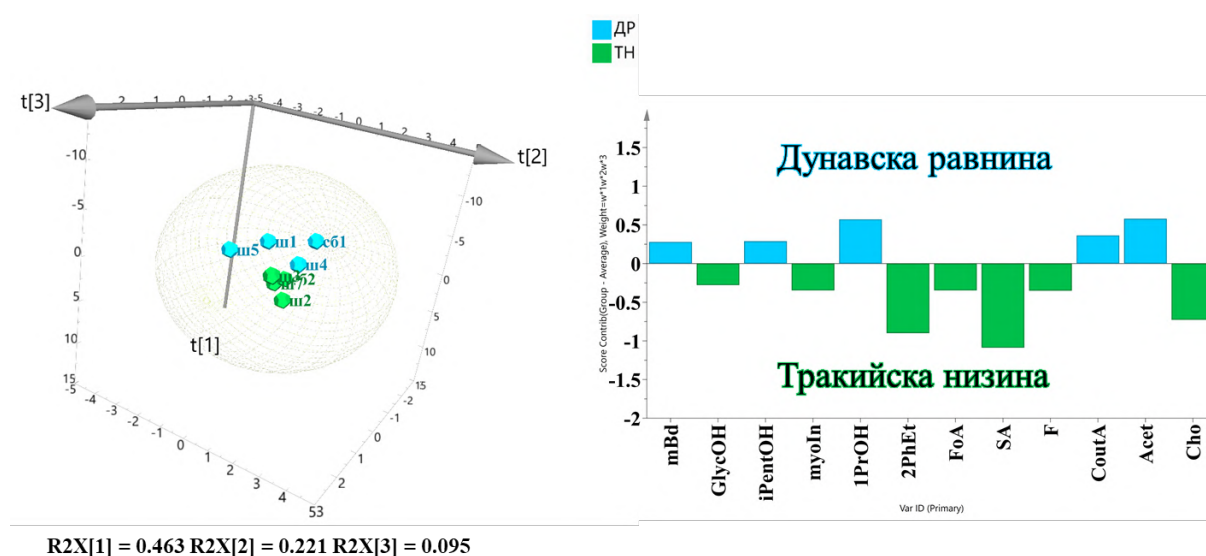
Фигура 71. Диаграми на *Nightingale*, сравняващи съдържанието на местни български и чуждестранни бели и червени вина

Във вината от типично български сортове се наблюдава над 1.6 пъти по-високо съдържание на галактуронова и ябълчена киселини. Открива се и по-голямо количество на някои алкохоли – мио-инозитол, 1-пропанол, 2-фенилетанол, на винена и янтарна киселини, аланин, на повечето захариди – арабиноза, галактоза, захароза и на холин. За бели български вина Димят и Мискет е характерно наличие на повече глицерол, изобутанол и метанол, лимонена киселина и фенолни компоненти - кафтарова и кутарова

киселини, а за червените вина от сортовете Мавруд, Мелник, Мелник-55, Рубин – изопентанол, глюкоза и фруктоза, кафеена киселина и тригонелин. Количествата на някои органични и аминокиселини като млечна, мравчена и шикимова киселини, пролин и тирозин, както и на ацеталдехид и ацетоин са в по-ниски концентрации в белите и червени традиционни български вина. Тези отличителни характеристики, вероятно са свързани с вкусовите предпочитания на българите за по-плътно вино.

2.2.6. Разграничаване на вино по географски произход

Освен използвания сорт грозде и методът на производство, климатът и релефът също оказват влияние върху състава на виното. В настоящата дисертация сравнихме осем от анализирани бели вина – 6 проби Шардоне и 2 проби Совиньон блан и осем от червените вина – 2 проби Каберне Совиньон, 2 проби Каберне Фран, 2 проби Мерло и 2 проби Сира, произведени в двете ЗГУ в България. За да бъде ограничено влиянието на сорта грозде, белите и червените вина са разгледани поотделно. Пробите от всеки цвят вино разделихме в две групи, съдържащи равен брой вина от еднакъв сорт грозде и различен географски произход. За определяне на компонентите, специфични за разграничаване на бели вина от Дунавската равнина (ДР) и от Тракийската низина (ТН) приложихме PLS-DA. Чрез VIP характеристики установихме 12 вещества (кутарова, мравчена и янтарна киселини, фруктоза, мезо-2,3-бутандиол, 1-пропанол, изопентанол, глицерол, мио-инозитол, 2-фенилетанол, ацетоин и холин), които позволяват различаване на вината, произведени в двете области и които използвахме за създаване на нов PLS-DA модел. Тримерна графика на резултатите, както и приносът на отделните компоненти за двата класа са изобразени на Фигура 72.



Фигура 72. Тримерна графика на резултатите и принос на отделните компоненти за бели вина, произведени в Дунавска равнина (ДР) и Тракийска низина (ТН))

Белите вина от Дунавската равнина (*w1*, *w4*, *w5*, *сб1*) съдържат по-високи количества от повечето висши алкохоли (*mBd*, *iPentOH*, *1PrOH*), кутарова киселина и ацетоин, докато вината от Тракийската низина са по-богати на киселини (*FoA*, *SA*), захари (*F*), захарни алкохоли (*myoIn*), глицерол и 2-фенилетанол, вероятно поради по-малката температурна амплитуда и по-равномерното разпределение на валежи по сезони. В анализирани бели вина от Тракийската низина (*w2*, *w3*, *w7*, *сб2*) се наблюдават и по-големи концентрации

на холин. Освен от климата, разликите може да са в резултат на по-малък наклон на релефа в Тракийската низина, както и от разлика във видовете почви.

Аналогичен хемометричен анализ е извършен за определяне на значимите компоненти за разграничаване на червени вина от защитените географски указания в страната. Чрез VIP параметър са отличени 12 вещества, характеризиращи вина от двете области, като шест от тях (*1PrOH*, *FoA*, *F*, *CoutA*, *Acet*, *Cho*) са идентични с установените в белите вина. В червени и бели вина от Тракийската низина се съдържат по-голямо количество захари (*F*, *Su*) и холин. В червените вина от Дунавската равнина (*кф2*, *кс4*, *м3*, *с3*), подобно на белите вина от същата област, се откриват повече алкохоли (*MeOH*, *1PrOH*), както и аминокиселини (*Ala*, *Pro*), кафеена киселина и тригонелин. Ацетоин и кутарова киселина са характерни за червени вина от области на юг от Стара планина (*кф1*, *кс2*, *м9*, *с1*), но по-висока концентрация се измерва и в бели вина от Дунавската равнина. Количеството мравчена киселина е по-голямо в червени вина, произведени на юг от р. Дунав, както и в бели вина от Тракийската низина. Тези разлики показват, че климатът и релефът оказват различно влияние върху някои компоненти в белите и червените видове грозде, съответно върху белите и червени вина, произведени от тях.

Двата PLS-DA модела са валидирани чрез матрици на класификациите, в които не се открива неправилно класифициране на нито една от изследваните проби, но са необходими бъдещи изследвания, включващи по-голям брой обекти.

2.3. Други продукти с високо съдържание на захари

2.3.1. Медовина

Медовината, подобно на меда и виното притежава полезни за човешкото здраве свойства. Нейният състав е слабо изучен, въпреки употребата ѝ от над 9 хил. години, като в литературата липсват данни за химичния ѝ профил и сравнение с химичния профил на вино. Интересно за нас бе проучване на компонентите в медовина за определяне качеството на използвания за производството ѝ мед, за наличие на некоректно разреждане на медовина или неправилно класифициране на т. нар. „фалшива медовина“ - нискокачествено бяло вино, в което е разтворен пчелен мед. Определихме прилики между трите хранителни продукта – мед, вино и медовина, като установихме захаридите, оставащи в медовината след ферментация на меда.

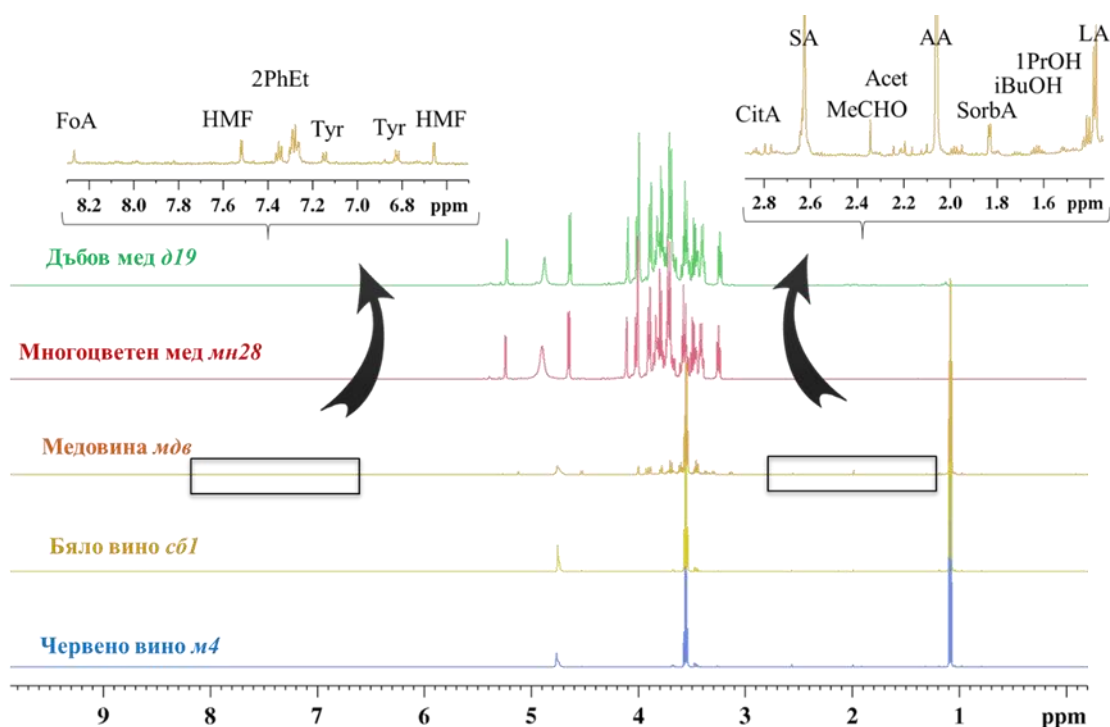
а) Качествен и количествен състав на органични компоненти в медовина

В медовината се съдържат множество вещества в ниски концентрации, поради което подходящ метод за анализа ѝ е ^1H ЯМР спектроскопия. Ниското рН (3.0-3.2) на медовина и наличието на вече утвърден метод за количествено определяне на компоненти във вино, имащо подобна киселинност и състав - голямо количество вода, етанол, както и киселини, захари и други вещества, улесняват анализа на медовина с прилагане на аналогични условия за приготвяне на проби и регистриране на спектри. На анализ подложихме словенска медовина от билков мед (*мдв*), приготвена с добавяне на билки, като в протонния ѝ спектър се наблюдавахме сигнали за 21 компонента: мезо-2,3-бутандиол, етанол, изобутанол, изопентанол, метанол, 1-пропанол, 2-фенилетанол, лимонена, млечна, мравчена, оцетна, сорбинова и янтарна киселини, аланин, тирозин, глюкоза, фруктоза, ацеталдехид, ацетоин, тригонелин и ХМФ. Регистрирахме и сигнали за 8 захари: изомалтоза, коджибиоза, леукоза, малтоза, нигероза, $\alpha\alpha$ -трехалоза, тураноза и рафиноза, вероятно произхождащи от меда, въпреки ферментацията му, както и за фумарова киселина. Структурата на съединенията потвърдихме чрез двумерни експерименти – JRES, TOCSY, HSQC.

Количествата на идентифицираните компоненти определихме чрез формулата от изследването на *Godelmann*,²¹ приложена и за анализ на вино (Стр. 16, Глава 2.2.1), като поради припокриване на сигнала и бавна релаксация не сме определяли количеството на оцетна киселина.

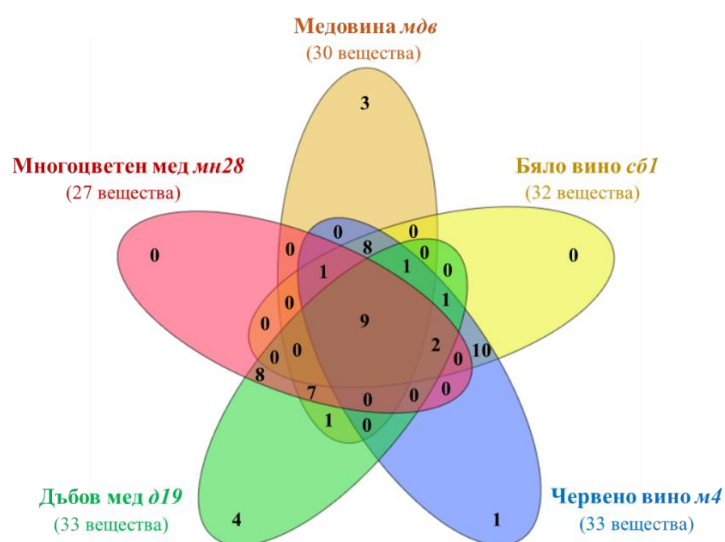
б) Сравнение на медовина, мед и вино

За установяване на приликите в състава на медовина, мед и вино, протонен спектър на медовина с потискане сигнала на разтворителя сравнихме със спектри на двата основни вида мед – многоцветен нектарен (*мн28*) и дъбов манов (*д19*) мед, както и с два вида вино – бяло (*сб1*) и червено (*м4*). Протонните им спектри са представени на Фигура 74, като за мащабиране на тези спектри използвахме количеството на сигнала на TSP (δ 0.00 м.ч).



Фигура 74. ^1H ЯМР спектри на мед (манов и нектарен), медовина и вино (бяло и червено)

Сравнение на спектрите показва разлики в състава на отделните храни и алкохолни напитки, като общите компоненти в петте продукта са девет: млечна, мравчена, оцетна и янтарна киселини, аланин, тирозин, глюкоза, фруктоза и тригонелин. В спектъра на медовината не се наблюдават сигнали за фенолни компоненти, въпреки декларираното добавяне на билки при производството ѝ. По-ясна картина на приликите и различията в броя на установените вещества в медовина, вино и мед представя Venn диаграмата на Фигура 75.

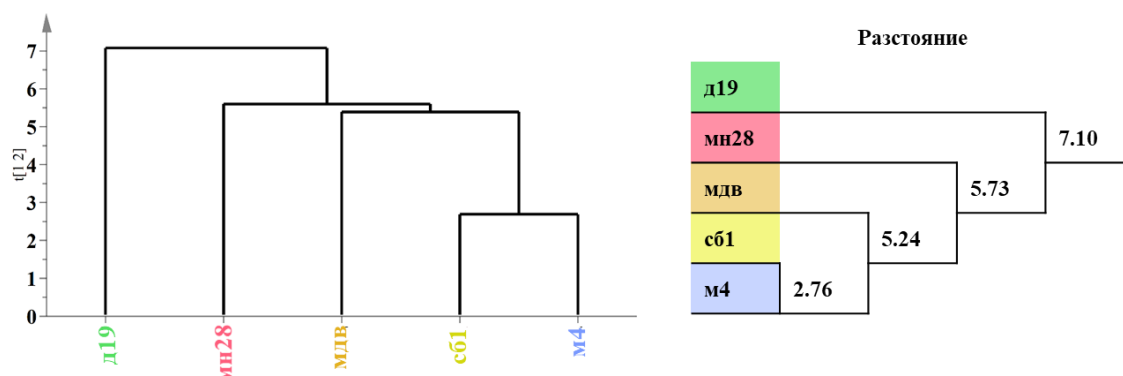


Фигура 75. Venn диаграма, описваща приликите в броя на съединенията, установени в проби мед, вино и медовина

От 30^{те} идентифицирани вещества в медовина, три са налични само в нея: сорбинова киселина (или сорбат) – добавена като консервант от производителя, фумарова киселина – прибавена за контрол на киселинността и за предотвратяване протичане на млечно-

кисела ферментация и ХМФ – получен в следствие от нагряване на меда. Осем са идентичните компоненти в състава на вино и медовина, като те са предимно алкохоли и други продукти на ферментация на основните захари: мезо-2,3-бутандиол, етанол, изобутанол, изопентанол, метанол, 1-пропанол, 2-фенилетанол, ацетоин и ацеталдехид, като и в трите проби (мдв, сб1, м4) се съдържа лимонена киселина. Етанол се наблюдава в медовината, нектарния мед и във виното. Веществата, които се срещат единствено в двата вида вино са 10: два алкохола - глицерол и мио-инозитол, органични киселини - винена, галактуронова и ябълчена киселини, два монозахарида -арабиноза и галактоза, две фенолни киселини - кафтарова и кутарова, и холин. Характерно вещество за червено вино е кафеена киселина, а шикимова киселина е част от състава на вината и на дъбовия мед. Повечето от десетте вещества, с изключение на глицерол и винена киселина, които могат да бъдат изкуствено добавени от производители, биха могли да се използват като маркери за „фалшива“ медовина, тъй като не се срещат в натуралната. Единствено в нектарния мед не е наличен мезо-2,3-бутандиол. Общи компоненти в медовина и двата вида мед са седем – изомалтоза, коджибиоза, леукроза, малтоза, нигероза, тураноза и рафиноза, а осем са еднаквите вещества в дъбов и многоцветен мед – валин, фенилаланин, изомалтулоза, малтулоза, $\alpha\beta$ -трехалоза, трехалулоза, ерлоза и мелецитоза, които не се регистрират в спектъра на медовината. $\alpha\alpha$ -Трехалоза влиза в състава на дъбовия мед и медовината, като в съдържанието на проба мдв отсъстват маркерите за манов мед – кверцитол, 1-кестоза, паноза, (R*S*) 2,3-бутандиол. В медовината липсва захароза и пролин, които вероятно дрождите използват като енергиен източник. Сравнение на количествата на общите компоненти в петте проби позволява определяне на най-близкия по състав до медовина хранителен продукт.

За целта използвахме количествени данни както за идентифицираните от ^{13}C ЯМР спектрите съединения в г/100г, така и за компонентите, притежаващи неприпокрити сигнали в ^1H ЯМР спектрите - аланин, валин, тирозин, фенилаланин, млечна, мравчена, шикимова и янтарна киселини, етанол, тригонелин, определени чрез деконволюция на сигналите в пробите мед. Преизчислихме ги в мг/л, използвайки стойностите за плътност (ρ) на всички установени в меда вещества и формулата на *Godelmann*, за сравнение със съединенията в медовина и вино посредством клъстерен анализ. Дендрограма и стойности на разстоянията между отделните клъстери са показани на Фигура 77.



Фигура 77. Дендрограма, включваща групиране на проби мед, вино и медовина и разстояние между отделните клъстери

Дендрограмата показва групиране на двете вина, породено от приликите в съдържанието им. Образуваният клъстер на виното е свързан с медовината, като разстоянието между

тях е по-малко от разстоянието между клъстера на алкохолните напитки и многоцветния мед. Дъбовият манов мед се отличава по състав от всички останали проби.

Сравнение на захарните профили на нектарен мед и медовина идентифицира захаридите, оставащи след ферментацията. В медовината напълно отсъстват дизахаридите изомалтулоза, малтулоза, захароза, $\alpha\beta$ -трехалоза и трехалулоза, както и повечето тризахариди – ерлоза и мелецитоза. Количествата на основните захари в меда глюкоза и фруктоза, както и изомалтоза и рафиноза са намалели с над 80%, а концентрациите на коджибиоза, малтоза, нигероза и тураноза са спаднали 2 до 2.5 пъти. Най-устойчив е захаридът леукроза, запазващ 68% от количеството си след ферментация, а под действието на дрожди и ензими се образува дизахаридът $\alpha\alpha$ -трехалоза. Въпреки драстичния спад в концентрацията на захарите, маркерът за разреден мед – малтоза не се преобразува напълно и би могъл да се използва за определяне качеството на меда, прилаган при производство на медовина.

2.3.2. Борово сладко

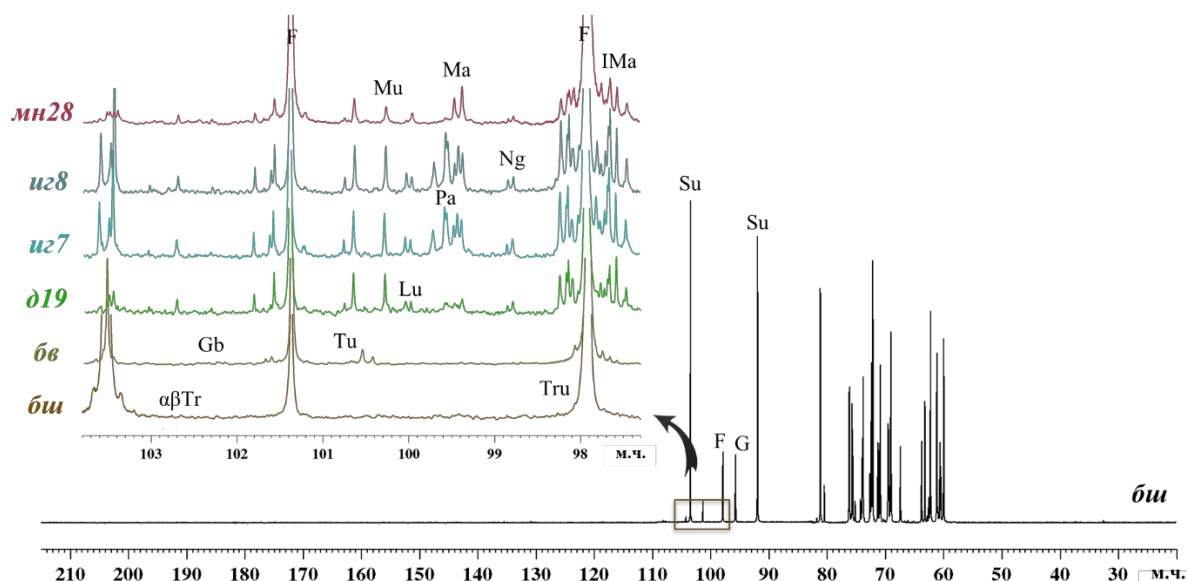
Боровото сладко, подобно на други продукти, съдържащи голямо количество захариди често бива представяно за вид пчелен мед. Въпреки вековното му приложение в народната медицина в литературата липсват нови задълбочени изследвания върху състава му и сравнение с пчелния мед. С цел предотвратяване на фалшифицирането му, освен количествен анализ на органичните вещества в сладкото е целесъобразно и установяване на разликите в съставите на сладко от борови шишарки и от борови връхчета.

а) Качествен и количествен състав на органичните компоненти в сладка

Наличието на висока концентрация захари в сладката, установените техни химични отмествания, както и разработеният количествен метод на основата на ^{13}C спектри улесняват анализа на различни по вид сладки хранителни продукти. Приложихме протонни ($zgcprr$) и въглеродни ($zgdc30$) спектри, регистрирани с параметри, подобни на използваните при анализ на пчелен мед за определяне на компонентите в два вида сладко – от борови шишарки (*биш*) и от борови връхчета (*бв*). Пригответихме пробите чрез разтваряне на 0.5 г сладко в 0.5 мл D_2O . Идентифицирахме два монозахарида *G*, *F*, 11 дизахариди *Gb*, *Su*, *IMa*, *IMu*, *Kb*, *Ma*, *Mu*, $\alpha\alpha Tr$, $\alpha\beta Tr$, *Tru*, *Tu* и 3 тризахарида *Mr*, *Pa*, *Rf*, като определихме количествата им чрез височините на сигналите в ^{13}C ЯМР спектри и методологията, описана на стр. 4, Глава 2.1.1. Освен идентифицираните захари в спектъра на проба *бв* се наблюдават и 4 неидентифицирани компонента, аналогични на установените в пчелен мед – *U1*, *U2*, *U11* и *U14*.

б) Сравнение между борово сладко и мед

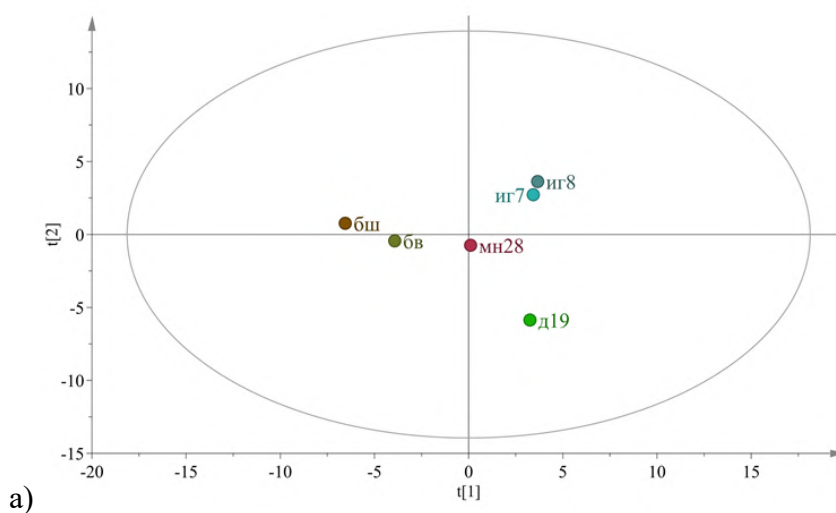
Захарният профил на двете борови сладка (*биш* и *бв*)²² сравнихме с установените вещества в четири проби мед – един многоцветен нектарен (*мн28*), един дъбов манов (*д19*) и два манови от иглолистна растителност (*иг7* – от ела и *иг8* – от бор). Част от аномерната област на техните ^{13}C ЯМР спектри (103.9-97.3 м.ч.), заедно с идентифицирани сигнали на някои от захаридите са представени на Фигура 79.

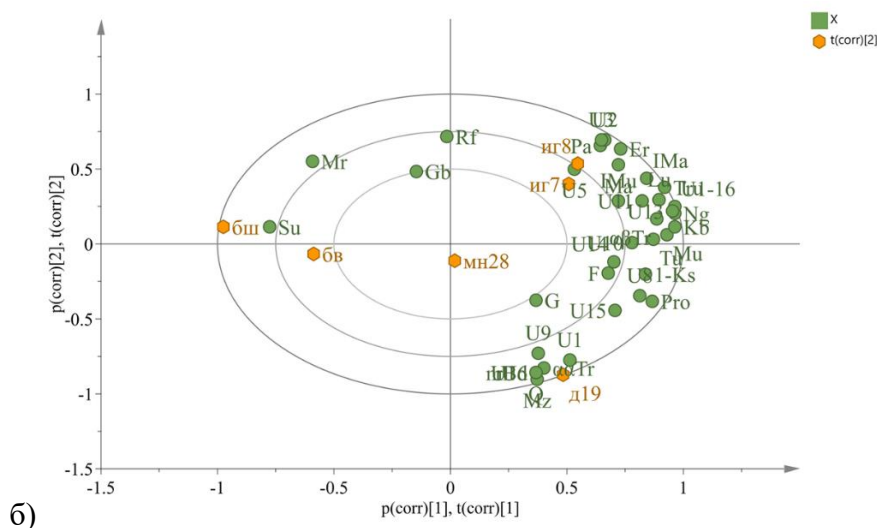


Фигура 79. Сравнение на ^{13}C ЯМР спектри на проби сладко и мед

От спектрите ясно се вижда голямо количество захароза ($>40\text{г}/100\text{г}$) в проба бш, както и ниски концентрации или липса на останалите олигозахариди, характерни за пчелния мед. Това високо съдържание на захар, вероятно се дължи на техниката за производство на продукта, като голямо количество захароза не се открива в сладко от борови връхчета, където концентрацията е под приетия максимум за меда – $5\text{г}/100\text{г}$. Стойностите за основните захариди глюкоза, фруктоза и тураноза в проба бв са сходни с тези в различните видове пчелен мед.

Чрез хеометричен метод без предварително зададени класове – анализ на главните компоненти установихме разликите в съдържанието на четири проби мед и две проби сладко. Графика на резултатите, използваща първите два принципни компонента и биplot към нея са представени на Фигура 80.



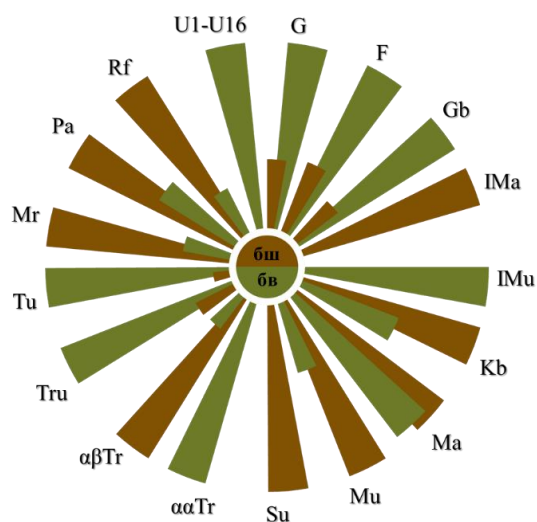


Фигура 80. а) Двумерна графика на резултатите и б) биплот от приложен PCA анализ

Анализът показва близкия състав на двете борови сладка, независимо от значителното количество захароза в бш. Наблюдава се и сходство в съдържанието на двете проби мед от иглолистна растителност (u27 и u28). Биплотът показва множество вещества в по-високи концентрации във всички проби пчелен мед – изомалтоза, изомалтулоза, коджибиоза, леукроза, малтоза, малтулоза, нигероза, трехалулоза, тураноза, $\alpha\beta$ -трехалоза, ерлоза и пролин, като се наблюдават и вече установените маркери за мед от дъб (кверцитол, 2,3-бутандиол) и от иглолистна растителност (паноза). Стойностите по вертикалната ос на графиката показват, че сладката и пробите мед от иглолистна растителност съдържат повече гентиобиоза, малтотриоза и рафиноза. Боровите сладка се характеризират с по-големи количества захароза.

в) Разлики в захарния профил на сладко от борови шишарки и на сладко от борови връхчета

Въпреки множеството прилики в състава на двете сладка, установени чрез хеометричните анализи, съществуват и разлики в съдържанието им. Те са изобразени чрез диаграма на *Nightingale*, визуализирана на Фигура 83.



Фигура 83. Диаграма на *Nightingale*, сравняваща захарен профил на сладко от борови шишарки (бш) и сладко от борови връхчета (бв)

Диаграмата показва, че двете проби не се различават по количеството на малтоза. Освен по-висока концентрация на захароза, в сладкото от борови шишарки са включени между 1.6 и 2.8 пъти по-големи количества коджибиоза, малтулоза и $\alpha\beta$ -трехалоза, както и установените в сладката тризахариди. В проба *би* липсва $\alpha\alpha$ -трехалоза, а част от фруктоолигозахаридите - тураноза и трехалулоза, са с над 60% по-ниски концентрации. Изомалтоза е предполагаем маркер за сладко от борови шишарки, а изомалтулоза не е установена в него. За потвърждаване на тези характеристични захариди са необходими изследвания на по-голям брой проби.

Глава 3. Заключение

Проведените изследвания върху 300 проби пчелен мед, 70 проби вино, 2 проби борово сладко и 1 проба медовина са с иновативен характер по отношение контрол на качеството и автентичността на изброените хранителни продукти. Получените резултати са с научен и научно-приложен характер, и могат да се обобщят в следните изводи:

1. Установени са оптималните условия и параметри за анализ на пчелен мед посредством ЯМР метаболомика.
2. Предложена е методика за полуколичествено определяне на 41 компонента в пчелен мед и борови сладка посредством ^{13}C ЯМР спектри.
3. Странджанският дъбов манов мед може да бъде различен от дъбов мед с друг географски произход.
4. Характеристичен тризахарид за дъбов манов мед е 1-кестоза, както и мезо-2,3-бутандиол. Не се наблюдава високо количество мелецитоза, описано като специфично за манов мед.
5. За първи път е установено наличие на редуциращия монозахарид хиновоза в пчелен мед.
6. За първи път е експериментално доказано наличие на високи количества трехалулоза в мед от африкански безжилни пчели посредством ^{13}C ЯМР спектроскопия.
7. Извършен е набор от хеометрични анализи за установяване произхода на мед и вино. Те позволяват определяне на ботанически произход и държава, производител на пчелен мед, както и район на българското лозе, от което е произведено виното.
8. Показано е, че вина от типични български сортове се характеризират с по-високо количество захари и алкохоли в сравнение с вина от международни сортове грозде.
9. Разработени са бързи методи за разпознаване на разреден мед и вино чрез регистриране на протонни спектри.
10. Предложен е метод за пресмятане на оптичен ъгъл на въртене на пчелен мед в зависимост от количествата на съдържащите се захари, позволяващ лесно идентифициране на разреден пчелен мед.
11. За първи път чрез ЯМР базирана метаболомика са определени профилите на два вида борово сладко и медовина, като са показани прилики в състава на мед и сладко, както и на мед, вино и медовина.

Глава 4. Литература

- ¹ Johnson, R., Food fraud and economically motivated adulteration of food and food ingredients. Congressional Research Service Washington DC: **2014**.
- ² <https://www.europol.europa.eu/activities-services/europol-in-action/operations/operation-opson> (последно използвана на 15.05.2022 г.)
- ³ Manning, L.; Smith, R.; Soon, J. M., Developing an organizational typology of criminals in the meat supply chain. *Food Policy* **2016**, 59, 44-54.
- ⁴ Siddiqi, K.; Nollet, L., *Fingerprinting Techniques in Food Authentication and Traceability*. CRC Press **2019**.
- ⁵ Wishart, D. S., Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science & Technology* **2008**, 19 (9), 482-493.
- ⁶ Gowda, N.; Raftery, D., *NMR-Based Metabolomics: Methods and Protocols*. Springer **2019**.
- ⁷ Ralli, E.; Amargianitaki, M.; Manolopoulou, E.; Misiak, M.; Markakis, G.; Tachtalidou, S.; Kolesnikova, A.; Dais, P.; Spyros, A., NMR Spectroscopy Protocols for Food Metabolomics Applications. *Methods in molecular biology* **2018**, 1738, 203-211.
- ⁸ Tomassini, A.; Capuani, G.; Delfini, M.; Miccheli, A., *NMR-Based Metabolomics in Food Quality Control*. In *Data Handling in Science and Technology*, Elsevier **2013**; 28, 411-447.
- ⁹ OIV, Statistical Report on World Vitiviniculture, **2019**, (<https://www.oiv.int/en/statistiques/?year=2019&countryCode=BGR> (последно използвана на 15.05.2022 г.))
- ¹⁰ Malz, F.; Jancke, H. Validation of quantitative NMR. ¹H and ¹³C NMR for the Profiling of Natural Product Extracts: Theory and Applications, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2005**, 38, 813-823
- ¹¹ Gerginova, D.; Simova, S.; Popova, M.; Stefova, M.; Stanoeva, J. P.; Bankova, V., NMR Profiling of North Macedonian and Bulgarian Honeys for Detection of Botanical and Geographical Origin. *Molecules* **2020**, 25 (20), 4687.
- ¹² Kazalaki, A.; Misiak, M.; Spyros, A.; Dais, P., Identification and quantitative determination of carbohydrate molecules in Greek honey by employing ¹³C NMR spectroscopy. *Analytical Methods* **2015**, 7 (14), 5962-5972
- ¹³ Гергинова, Д.; Митрев, Я.; Симова, С., Приложение на ЯМР метаболомика за анализ на пчелен мед от мурсалски чай. *Списание на БАН* **2021**, 4, 9-16.
- ¹⁴ Cagliani, L. R.; Maestri, G.; Consonni, R; Detection and evaluation of saccharide adulteration in Italian honey by NMR spectroscopy *Food Control* **2022**, 133, 108574
- ¹⁵ Musharraf, S. G.; Ambreen Fatima, S.; Siddiqui, A. J.; Iqbal Choudhary, M.; Atta ur, R., ¹H-NMR fingerprinting of brown rice syrup as a common adulterant in honey. *Analytical Methods* **2016**, 8 (34), 6444-6451.
- ¹⁶ Kortensniemi, M.; Slupsky, C. M.; Ollikka, T.; Kauko, L.; Spevacek, A. R.; Sjövall, O.; Yang, B.; Kallio, H., NMR profiling clarifies the characterization of Finnish honeys of different botanical origins. *Food Research International* **2016**, 86, 83-92
- ¹⁷ Simova, S.; Atanassov, A.; Shishinova, M.; Bankova, V., A rapid differentiation between oak honeydew honey and nectar and other honeydew honeys by NMR spectroscopy. *Food Chemistry* **2012**, 134 (3), 1706-1710
- ¹⁸ Popova, M.; Gerginova, D.; Trusheva, B.; Simova, S.; Tamfu, A.N.; Ceylan, O.; Clark, K.; Bankova, V., A preliminary study of chemical profiles of honey, cerumen, and propolis of the african stingless bee meliponula ferruginea. *Foods* **2021**, 10 (5), 997
- ¹⁹ White, J.; Hobbs, L.; Fernandez, S., Fructose content and composition of commercial HFCS-sweetened carbonated beverages. *International Journal of Obesity* **2015**, 39, 176-182
- ²⁰ Résolution OIV-oeno 618-2020, **2020**, <https://www.oiv.int/public/medias/7590/oiv-oeno-618-2020-en.pdf>
- ²¹ Godelmann, R.; Kost, C.; Patz, C. D.; Ristow, R.; Wachter, H., Quantitation of Compounds in Wine Using (1)H NMR Spectroscopy: Description of the Method and Collaborative Study. *Journal of AOAC International* **2016**, 99 (5), 1295-1304.
- ²² Gerginova, D.; Dimova, D.; Simova, S., Preliminary NMR and chemometric study of pine jams used as medicinal remedies. *Bulgarian Chemical Communications* **2017**, 49D, 215-220

Списък с научни публикации по темата на дисертацията

I. Gerginova, D.; Dimova, D.; Simova, S., Preliminary NMR and chemometric study of pine jams used as medicinal remedies. Bulgarian Chemical Communications 2017, 49(Sp. Iss. D), 215-220, SJR (Scopus):0.156, JCR-IF (Web of Science):0.242, Q4 (Web of Science)

Забелязани цитати:

1. Valerón, N.R.; Vásquez, D.P.; Munk, R., The Pinaceae species, flavor attributes for new culinary spices. *International Journal of Gastronomy and Food Science* 2021, 23, 100306, DOI:10.1016/j.ijgfs.2021.100306

II. Gerginova, D.; Simova, S.; Popova, M.; Stefova, M.; Stanoeva, J.P.; Bankova, V., NMR profiling of North Macedonian and Bulgarian honeys for detection of botanical and geographical origin. Molecules 2020, 25(20), 4687, DOI:10.3390/molecules25204687, SJR (Scopus):0.782, JCR-IF (Web of Science):4.412, Q1 (Scopus)

Забелязани цитати:

2. Cucu, A.A.; Baci, G. M.; Moise, A.R.; Dezs, Ş.; Marc, B.D.; Stângaciu, Ş.; Dezmirean, D. S., Towards a Better Understanding of Nutritional and Therapeutic Effects of Honey and Their Applications in Apitherapy. *Applied Sciences* 2021, 11(9), 4190 DOI:10.3390/app11094190
3. Dimitrakopoulou, M.E.; Matzarapi, K.; Chasapi, S.; Vantarakis, A.; Spyroulias, G.A., Nontargeted ¹H NMR fingerprinting and multivariate statistical analysis for traceability of Greek PDO Vostizza currants. *Journal of Food Science* 2021, 86(10), 4417-4429. DOI:10.1111/1750-3841.15873
4. Suhandy, D.; Yulia, M., The use of UV spectroscopy and SIMCA for the authentication of Indonesian honeys according to botanical, entomological and geographical origins. *Molecules* 2021, 26(4), 915, DOI:10.3390/molecules26040915
5. Labsvards, K.D.; Rudovica, V.; Kluga, R.; Rusko, J.; Busa, L.; Bertins, M.; Eglite, I.; Naumenko, J.; Salajeva, M.; Viksna, A., Determination of Floral Origin Markers of Latvian Honey by Using IRMS, UHPLC-HRMS, and ¹H-NMR. *Foods* 2022, 11(1), 42. DOI:10.3390/foods11010042

III. Popova, M.; Gerginova, D.; Trusheva, B.; Simova, S.; Tamfu, A.N.; Ceylan, O.; Clark, K.; Bankova, V., A preliminary study of chemical profiles of honey, cerumen, and propolis of the African stingless bee *Meliponula ferruginea*. Foods 2021, 10(5), DOI:10.3390/foods10050997, SJR (Scopus):0.726, JCR-IF (Web of Science):4.350, Q1 (Scopus)

Забелязани цитати:

6. Barbieri, J.G., Estudo computacional da reatividade e do mecanismo de fragmentação de butirolactonas e derivados. *Дисертация, Universidade de São Paulo* 2021. DOI:10.11606/D.59.2021.tde-11012022-173313
7. Onem, E.; Soyocak, A.; Muhammed, M.T., Ak, A., In vitro and in silico assessment of the potential of Niaouli essential oil as a quorum sensing inhibitor of biofilm formation and its effects on fibroblast cell viability. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2021, 64, e21200782. DOI:10.1590/1678-4324-2021200782

8. Vit, P.; Maza, F., *Metabolomics applications in bee science*. *World Journal of Pharmaceutical Sciences* 2021, 9(10), 34–40. DOI:10.54037/WJPS.2021.91007
9. Zulhendri, F.; Chandrasekaran, K.; Kowacz, M.; Ravalia, M.; Kripal, K.; Fearnley, J.; Perera C.O., *Antiviral, antibacterial, antifungal, and antiparasitic properties of propolis: A Review*. *Foods* 2021, 10(6), 1360. DOI:10.3390/foods10061360
10. Medina-Jaramillo, C.; Carvajal-Díaz, L.M.; López-Córdoba, A.F., *Propolis from native Stingless Bees: ultrasound-assisted extraction*. *Vitae* 2022, 29(2), DOI:10.17533/udea.vitae.v29n2a347446
11. Ożarowski, M.; Karpiński, T.M.; Alam, R.; Łochyńska, M., *Antifungal Properties of Chemically Defined Propolis from Various Geographical Regions*. *Microorganisms* 2022, 10(2), 364. DOI:10.3390/microorganisms10020364
12. Wiczorek, P.P.; Hudz, N.; Yezerska, O.; Horčinová-Sedláčková, V.; Shanaida, M.; Korytniuk, O.; Jasicka-Misiak, I., *Chemical Variability and Pharmacological Potential of Propolis as a Source for the Development of New Pharmaceutical Products*. *Molecules* 2022, 27(5), 1600. DOI:10.3390/molecules27051600
13. Wu, M.C.; Wu, C.Y.; Klaithin, K.; Tiong, K.K.; Peng, C.C., *Effect of harvest time span on physicochemical properties, antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of Meliponinae honey*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2022. DOI:10.1002/jsfa.11924
14. Zulhendri, Z.; Perera, C.O.; Chandrasekaran, K.; Ghosh, A.; Tandean, S.; Abdulah, R.; Herman, H.; Lesmana, R., *Propolis of stingless bees for the development of novel functional food and nutraceutical ingredients: A systematic scoping review of the experimental evidence*. *Journal of Functional Foods* 2022, 88, 104902. DOI: 10.1016/j.jff.2021.104902
15. Zawawi, N.; Zhang, J.; Hungerford, N.L.; Yates, H.S.A.; Webber, D.C.; Farrell, M.; Tinggi, U.; Bhandari, B.; Fletcher, M.T., *Unique physicochemical properties and rare reducing sugar trehalulose mandate new international regulation for stingless bee honey*. *Food Chemistry* 2022, 373B, 131566. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.131566

IV. Gerginova, D.; Mitrev, Y.; Simova, S., *Application of NMR metabolomics for analysis of sideritis honey*. *Journal of the Bulgarian Academy of Sciences* 2021, 4, 9-16

Публикации извън темата на дисертацията

- I. Atanasova, M.; Angelov, R.; Gerginova, D.; Zahariev, A., 2019 – The international year of the periodic table of chemical elements. *Chemistry: Bulgarian Journal of Science Education* 2019, 28(6), 807-816. SJR (Scopus):0.102
- II. Dimitrova, P.A.; Alipieva, K.; Grozdanova, T.; Leseva, M.; Gerginova, D.; Simova, S.; Marchev, A.S.; Bankova, V.; Georgiev, M.I.; Popova, M., *Veronica austriaca L. extract and arbutin expand mature double TNF- α /IFN- γ neutrophils in murine bone marrow pool*. *Molecules* 2020, 25(15), DOI:10.3390/molecules25153410, 3410. SJR (Scopus):0.782, JCR-IF (Web of Science):4.412

- III. Atanassova, M.; Angelov, R.; Gerginova, D.; Karashanova, D., Neutral organophosphorus ligands as a molecular lab for simultaneous detecting of Ag(I) ions. *Journal of Molecular Liquids* 2021, 335, DOI:10.1016/j.molliq.2021.116287, 116287. SJR (Scopus):0.929, JCR-IF (Web of Science):6.165
- IV. Mantovska, D.I.; Zhipinova, M.K.; Georgiev, M.I.; Grozdanova, T.; Gerginova, D.; Alipieva, K.; Simova, S.; Popova, M.; Kapchina-Toteva, V.M.; Yordanova, Z.P., In vitro multiplication and NMR fingerprinting of rare *Veronica caucasica* M. Bieb. *Molecules* 2021, 26, 19, DOI:10.3390/molecules26195888, 5888. SJR (Scopus):0.782, JCR-IF (Web of Science):4.412

Глава от книга

- I. Mitrev, Y.; Gerginova, D.; Simova, S., Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Chemistry, *Encyclopedia of Analytical Science* 2019, трето издание, 459-471, DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14347-1

Списък на участия в научни конференции по темата

♦ Участия с доклади в България

1. Приложение на ЯМР метаболомика за контрол и автентикация на български вина – 20-22.04.2018, XI^{та} Пролетен семинар на младите учени и докторанти от БАН „Интердисциплинарна химия“, София (Gerginova, D.; Митрев, Я.; Симова, С.)
2. Ботанически произход на български пчелен мед посредством ЯМР спектроскопия – 16-18.05.2018, XVII Национална конференция по химия за студенти и докторанти, София (Gerginova, D.; Митрев, Я.; Симова, С.)
3. Пчелен мед – как да разпознаем истинския, използвайки ЯМР спектроскопия – 29-31.08.2019, Втори интердисциплинарен докторантски форум, Боровец (Gerginova, D.; Ророва, М.; Bankova, V.; Simova, S.) – присъдена награда
4. Пчелен мед – как да разпознаем истинския, използвайки ЯМР спектроскопия – 22-23.11.2019, 5^{та} Научна конференция за студенти и докторанти „Предизвикателства в химията“, Пловдив (Gerginova, D.; Ророва, М.; Bankova, V.; Simova, S.)
5. Bee Honey - How to recognize the real one using NMR spectroscopy – 12.02.2020, Global Women's Breakfast, София (Gerginova, D.; Simova, S.)

♦ Участия с доклади в научно мероприятие в чужбина или в международно научно мероприятие у нас

6. Authentication of Bulgarian honey using NMR and optical rotation – 07-10.05.2019, 5th International Symposium on Bee Products and International Honey Commission-Meeting, Малта (Gerginova, D.; Ророва, М.; Bankova, V.; Kurteva, V.; Simova, S.)
7. How to identify authentic honey using NMR spectroscopy – 19-21.2019, 13th Students' Congress of SCTM, Северна Македония (Gerginova, D.; Ророва, М.; Stefova, M.; Bankova, V.; Simova, S.)
8. Bee honey - tell the real one by NMR spectroscopy – 04-05.09.2019, 21st Central and Eastern European NMR Symposium & Bruker Users' Meeting, Сърбия (Simova, S.; Gerginova, D.)
9. NMR metabolomics – plants, honey and wine – 22-24.09.2020, 4th Adriatic NMR conference, Хърватия (Simova, S.; Gerginova, D.; Mitrev, Y.; Alipieva, K.)

♦ 9 участия с постери, от които наградени:

Comparative NMR spectroscopy analysis of honey, wine and honey wine (mead) – 17-18.04.2019, ИОХЦФ-БАН, София (Gerginova, D.; Mitrev, Y.; Simova, S.)

NMR-based metabolomics for discrimination of oak honeydew honey from Macedonia and Bulgaria – 29.05-01-06.2019, 4th International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf, Албена, (Gerginova, D.; Ророва, М.; Stefova, M.; Bankova, V.; Simova, S.)

Periodic table of compounds in wine using ¹H NMR spectroscopy and chemometrics - 05-12.07.2019, IUPAC 47th World Congress, Франция, (Gerginova, D.; Mitrev, Y.; Simova, S.)