

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Blaženka Buntić
6750/PT

UTJECAJ DODATKA PEKTOLITIČKIH ENZIMA NA
KOLORIMETRIJSKE KARAKTERISTIKE CRNOG VINA
ZAVRŠNI RAD

Modul: Kemija i tehnologija vina

Mentor: Prof.dr.sc. Mara Banović

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina

Utjecaj dodatka pektolitičkih enzima na kolorimetrijske karakteristike crnog vina

Blaženka Buntić, 6750/PT

Sažetak: Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj primjene pektolitičkih enzima (Vinozym Vintage FCE i Sihazym Extro) na boju crnog vina. Utjecaj enzima praćen je u odnosu na standardnu proizvodnju, maceracijom grožđa iste kakvoće, u istim uvjetima, bez dodatka enzima. Za vinifikaciju je odabrano grožđe sorte Babica i Crljenak kaštelanski iz vinograda na području Kaštela. Uzorci za praćenje kolorimetrijskih karakteristika su izuzimani prije i nakon dodatka SO₂, tijekom maceracije, te nakon prvog i drugog pretoka. Kolorimetar Konica Minolta korišten je za određivanje CIELAB vrijednosti: svjetlina (L), parametri a* (crvenilo) i b* (žutilo) te intenzitet (C) i nijansa (H). Iako su enzimi imali različit utjecaj na pojedine značajke boje kod ispitivanih sorti, njihova primjena pokazala je pozitivan utjecaj u odnosu na uzorke proizvedena standardnim postupkom.

Ključne riječi: CIELAB, crno vino, maceracija, pektolitički enzimi

Rad sadrži: 43 strane, 18 slika, 2 tablice, 31 literaturnih navoda, 2 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Prof.dr.sc. Mara Banović

Rad predan: 04.07.2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate study Food Technology
Department of Food Engineering
Laboratory for Technology and Analysis of Wine

The Impact of Pectolytic Enzymes on the Colorimetric Characteristics of Red Wine

Blaženka Buntić, 6640/PT

Abstract:

The aim of this study was to investigate the effect of pectolytic enzymes (Vinozym Vintage FCE and Sihazym Extro) on the colour of red wine. The effect of the enzymes was compared with standard maceration of the grapes of the same quality, in the same conditions, without addition of enzymes. Grape varieties Babica and Crljenak kaštelanski, from the area of Kaštela, were chosen for vinification. Samples for measuring the colorimetric characteristics are collected before and after addition of SO₂, during the maceration and after first and second racking. Konica Minolta Colorimeter was used to determine CIELAB values: brightness (L), parameters a * (redness) and b * (yellowness) and intensity (C) and hue (H). Although the enzymes had different effect on color characteristics their application has shown positive effect compared to the samples produced by a standard procedures.

Keywords: CIELAB, maceration, pectolytic enzymes, red wine

Thesis contains: 43 pages, 18 figures, 2 tables, 31 references, 2 supplements

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD Mara Banović, Professor

Thesis delivered: 04.07.2016.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Tehnologija proizvodnje crnih vina.....	4
2.2. Maceracija	6
2.2.1. Princip i kontrola maceracije.....	6
2.2.2. Utjecaj različitih faktora na proces maceracije	7
2.2.2.1. Duljina trajanja maceracije	7
2.2.2.2. Temperatura maceracije	7
2.2.2.3. Dodatak enzima	7
2.2.3. Tipovi maceacije	10
2.2.3.1. Hladna maceracija.....	10
2.2.3.2. Termovinifikacija.....	11
2.2.3.3. Karbonska maceracija	11
2.3. Polifenolni sastav vina.....	12
2.3.1. Flavonoidi.....	12
2.3.1.1. Antocijani.....	13
2.3.1.2. Proantocijanidini (kondenzirani tanini)	15
2.3.2. Neflavanoidi	15
2.4. Metode mjerenja boje	16
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Materijal.....	18
3.2. Metoda rada	19
4. REZULTATI.....	21
5. RASPRAVA.....	29
6. ZAKLJUČAK	35

7. LITERATURA.....	37
8. PRILOZI.....	41

1. UVOD

Fenolni spojevi pridonose kvaliteti vina, prvenstveno utječu na senzorska svojstva (boju, okus i miris) i sposobnost starenja vina. Osim pozitivnih učinka na kvalitetu vina, zbog svojih antibakterijskih i antioksidacijskih svojstava pozitivno utječu i na ljudsko zdravlje. Iako mogu nastati tijekom fermentacije djelovanjem kvasaca te starenjem iz drveta bačvi, većina polifenolnih spojeva ekstrahira se iz različitih dijelova grožđa tijekom procesa vinifikacije. Posebno bitni čimbenici kakvoće crnih vežu se uz polifenolna svojstva: sadržaj ukupnih fenola kao primarnog pokazatelja fenolne kakvoće, karakteristike boje (osnovni antocijanski sastav, spojevi koji nastaju vezanjem antocijana na druge molekule, intenzitet i postojanost boje), struktura polifenola glede odnosa trpkoca/gorčina.

Kod većine crnih sorti grožđa fenolni spojevi su smješteni u pokožici bobica. Stoga je u proizvodnji crnih vina potrebno odabrati odgovarajući postupak maceracije, s ciljem ekstrakcije tvari koje će vino dati određeno obojenje. U proizvodnji crnih vina koriste se različiti postupci maceracije kao što su: klasična maceracija kod koje se maceracija odvija istovremeno s fermentacijom, termovinifikacija, karbonska maceracija i druge.

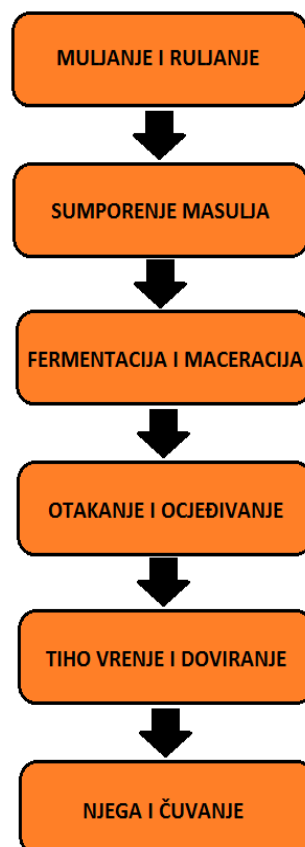
Jedan od načina poboljšanja kakvoće crnih vina jest primjena pektolitičkih enzima u postupku maceracije masulja. Pektolitički enzimi koriste se desetljećima u vinarstvu; od 1950-tih primjenjuju se kod bijelih vina zbog poboljšanja filtrabilnosti, iskorištenja soka te boljeg profila arome, a enzimatska aktivnost se očituje u pucanju pektina koji je odgovoran za čvrstoću staničja bobice. Danas se sve više koriste u proizvodnji crnih vina, radi bolje ekstrakcije i stabilnosti boje, ekstrakcije tanina te poboljšanja svojstava.

U ovom radu provest će se ispitivanje utjecaja pektolitičkih enzima (Vinozym Vintage FCE i Sihazym Extro) na boju vina proizvedenog u poluindustrijskom mjerilu od dvije sorte grožđa: Babica i Crljenak kaštelanski. Analiza boje uključiti će CIELAB mjerenje, te će se dobivene vrijednosti za L, a*, b*, C i H koristiti za opis boje vina.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Tehnologija proizvodnje crnih vina

Crna vina proizvode se od sorti crnog grožđa, koje sadrže crvene pigmente antocijane, koji su kod većine vinskih sorti smješteni u stanicama pokožice, a samo kod nekih su prisutni i u mesu bobice. Razlikuju se od bijelih vina ne samo po boji nego i po kemijskom sastavu, okusu i mirisu, punija su, ekstraktivnija, manje ili više trpkava zbog veće količine obojenih, taninskih i mineralnih tvari. Kako bi se dobilo crno vino potrebno je ekstrahirati antocijane iz pokožice što se postiže postupcima maceracije i alkoholne fermentacije. Za razliku od bijelih u proizvodnji crnih vina, mošt se ne odvaja od komine već se provodi alkoholna fermentacija cjelokupnog masulja. Osnovne faze proizvodnje crnih vina prikazane su na Slici 1.



Slika 1. Kratki prikaz proizvodnje crnih vina (Jackson, 2008)

Prva faza u preradi grožđa najčešće je ruljanje i muljanje; bobica se odvaja od peteljke (izbjegava se maceracija s peteljkama jer sadrži «grube» polifenole koji kasnije remete organoleptičke karakteristike vina) i gnječi da se oslobodi sok – mošt. Nakon ruljanja i muljanja, mošt se ne odvaja od sjemenki i kožica, već one ostaju u grožđanom soku kako bi se izlučilo što više tvari boje, arome i tanina. U tom trenutku se vrši sumporenje (sulfitiranje) masulja, koje je neophodno jer se na taj način pospješuje proces maceracije, smanjuje se oksidacija tvari boje, vrši se selekcija kvasaca te potpomaže u koagulaciji bjelančevina i drugih sluzastih tvari (Jackson, 2008).

Na kakvoću crnog vina najviše utječe vrijeme trajanja maceracije. Tijekom maceracije u mošt prelaze antocijani i drugi fenolni spojevi, te aromatične, dušične i mineralne tvari. Antocijani i tanini su odgovorni za boju i strukturu vina. Antocijani najvećim dijelom prelaze u mošt za vrijeme trajanja burne fermentacije, odnosno prvih 4-6 dana. Zatim se udio antocijana od osmog do desetog dana bitno ne mijenja, a nakon toga dolazi do njihovog opadanja, jer se vežu na peteljkovinu. Od ukupnog udjela antocijana prisutnih u pokožici tijekom maceracije u mošt prelazi oko 20-30%. Budući da taninske tvari prelaze u mošt tijekom cijelog procesa maceracije, vina koja duže odleže u komini sadrže više tanina, pa su stoga trpkija, oporija te manje harmonična (Riberreau-Gayon i sur., 2006).

Postoje dva tipa fermentacije: diskontinuirana i kontinuirana fermentacija. Zajedničko im je da se fermentacija i maceracija masulja odvijaju istovremeno. Za provođenje kontinuirane fermentacije postoje različiti postupci. Diskontinuirana fermentacija podrazumijeva otvorenu fermentaciju uz slobodan pristup zraka i zatvorenu fermentaciju bez pristupa zraka (Hornsey, 2007).

Nakon završene alkoholne fermentacije dobiva se mlado vino. Za postizanje željene kakvoće vino mora odležati određeno vrijeme, pri čemu dolazi do fizikalno kemijski promjena. To vrijeme naziva se dozrijevanje vina. Postupci koji se pri tome podrazumijevaju su: nadolijevanje posuđa, pretakanje, kupažiranje, postupci stabilizacije i bistrenja, filtracije te dozrijevanja vina u drvenim bačvama, inoks posudama, barrique, itd. (Ribereau-Gayon i sur., 2006a).

2.2. Maceracija

Crna vina su macerirana vina. Maceracija je proces u proizvodnji vina u kojem specifični kemijski spojevi prelaze iz pokožice, sjemenke, a ponekad i peteljke grožđa u mošt. U svakom od ovih dijelova nalaze se različiti polifenolni spojevi, te kombinacijom tih spojeva nastaju specifična i poželjna svojstva vina. Iako je u proizvodnji crnih vina primarna ekstrakcija fenolnih tvari (antocijana i tanina) koji sudjeluju u formiranju boje i cjelokupne strukture vina, istovremeno se ekstrahiraju i drugi sastojci: tvari arome, prekursori arome, spojevi s dušikom, polisaharidi (pektini), mineralni sastojci. Maceracija je odgovorna za sve specifične karakteristike boja okusa i mirisa kojima se crna vina razlikuju od bijelih vina (Radovanović, 1986).

2.2.1. Princip i kontrola maceracije

Tijekom procesa maceracije dolazi do odvijanja slijedećih mehanizama:

1. **Ekstrakcija i otapanje različitih tvari.** Prijelaz sadržaja stanične vakuole iz krute faze u tekuću fazu odvija se procesom otapanja. Otapanje prvenstveno ovisi o sorti, te o stupnju zrelosti grožđa. Muljanjem i djelovanjem enzima dolazi do razaranja tkiva, čime se olakšava otapanje, što je bitno za antocijane. Otapanje ovisi o različitim operacijama koje uključuju destrukciju tkiva: sulfoniranje, djelovanje etanola, anaerobioza, povišenje temperature, vremenski period maceracije.
2. **Difuzija ekstrahiranih tvari.** Otapanje se odvija u masulju. Izmjena tvari prestaje nakon što tekuća faza postane zasićena ekstrahiranim tvarima. Daljnje otapanje ovisi o difuziji ekstrahiranih tvari kroz masu.
3. **Vežanje ekstrahiranih tvari na pojedine sastojke u mediju: peteljke, pulpa, kvasci.**
4. **Modifikacija ekstrahiranih tvari.** Antocijani privremeno mogu prijeći u svoje bezbojne derivate. Reakcija je reverzibilna. U vremenu od 24h boja mladih vina izloženih zraku se pojačava, uz iznimku vina dobivenih od trulog grožđa. Pojačavanje boje može biti potaknuto stvaranjem antocijan-Fe³⁺ kompleksa uz prisutnost kisika (Ribereau-Gayon i sur., 2006).

2.2.2. Utjecaj različitih faktora na proces maceracije

Glavni faktori koji utječu na proces maceracije su: temperatura, koncentracija alkohola, prisutnost određenih enzima, prisutnost sumpora, te vrijeme trajanja maceracije. Utvrđeno je da na početku fermentacije kada je niža koncentracija alkohola puno više komponenti boje se ekstrahira iz pokožice nego kasnije pri višoj koncentraciji (Radovanović, 1986.).

2.2.2.1. Duljina trajanja maceracije

Također bitan čimbenik je vrijeme trajanja maceracije. Iako je ekstrakcija antocijana najveća tijekom prvih pet dana maceracije, produljenom maceracijom, ovisno o sorti, može se osigurati stabilnost fenolnog sastava i boje tijekom duljeg odležavanja vina. Postiže se bolja ekstrakcija tanina, te veće stvaranje polimeriziranih pigmenata koji su važni za postojanost kromatskih svojstava (Sacchi i sur., 2005).

2.2.2.2. Temperatura maceracije

Povećanjem temperature ubrzava se proces maceracije, te se pojačava otapanje tvari iz krutih dijelova grožđa. Temperatura je vrlo bitna ne samo kod termovinifikacije, nego i kod klasične maceracije, gdje mora biti dovoljno visoka, da se osigura optimalna ekstrakcija fenolnih spojeva. Kod produljene maceracije, visoka temperatura može uzrokovati pad koncentracije antocijana i intenziteta boje (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

2.2.2.3. Dodatak enzima

Enzimi su prirodni proteini, biološki katalizatori, koji imaju sposobnost ubrzavanja biokemijskih reakcija. Specifični su za samo jedan supstrat, te djeluju u jednom smjeru reakcije. Važan su element procesa proizvodnje vina, potječu iz grožđa, kvasaca i drugih mikroorganizama sa vinograda i vinskih podruma. No, enzimi grožđa nisu aktivni u prisutstvu SO₂ te PH uvjetima proizvodnje vina (izuzetak su gljivične pektinaze). Danas su oni komercionalni proizvod koji se može naći u gotovo svim vinarijama. Od pre-fermentativne faze, preko fermentacije, pa do post-fermentativne faze i starenja enzimi kataliziraju različite biotransformacijske reakcije, te imaju sposobnost ubrzavanja procesa proizvodnje vina (Mojsov i sur., 2015).

Stanična stjenka stanica bobice grožđa građena je od složenih polisaharida pektina, koji uz celulozu, kemicelulozu osiguravaju strukturu i čvrstoću stanice ploda. U unutrašnjosti

stanice nalazi se citoplazma s jezgrom, plastidima i sustavom enzima, te vakuola u kojoj su otopljeni fenoli, antocijani, šećeri, kiseline, soli i spojevi arome. Pektini su smješteni u središnjoj lameli stanične stjenke između stanica. Dok se u primarnoj staničnoj stjenci većinom nalaze celulozna vlakna u smjesi pektina, kemiceluloze i bjelančevina, u sekundarnoj staničnoj stjenci dominira pektin uz malo lignina. Tijekom ekstrakcije središnja lamela puca i oslobađa stanice, pucaju stanične stjenke, a sadržaj vakuole se oslobađa difuzijom ili ekstrakcijom. Na ovaj način se tumači princip maceracije, utjecaja SO₂, zagrijavanja i enzima pektinaza (Radovanović, 1986).

Pektolitički enzimi (pektinaze) kataliziraju razgradnju (hidrolizu) pektina. Tih enzima ima u masulju, ali se i kao enološka sredstva u postupku prerade mogu dodavati masulju naročito crnog grožđa. Upotrebljavaju se radi postizanja lakšeg tiještenja, zatim za lakše bistrenje, posebno u slučaju termičke obrade masulja, te imaju zadaću da povećaju ekstrakciju pigmenta i fenolnih spojeva te spojeva arome iz grožđa. Primjenom specifičnih pektinaza na početku maceracije, ali i na kruti dio na kraju fermentacije može rezultirati boljom i/ili dodatnom ekstrakcijom antocijana. Osim direktnog učinka na kromatska svojstva, enzimi utječu i na brzinu ekstrakcije i mogućnost skraćivanja vremena maceracije, te olakšano taloženje i filtraciju (Capounova i Drdak, 2002).

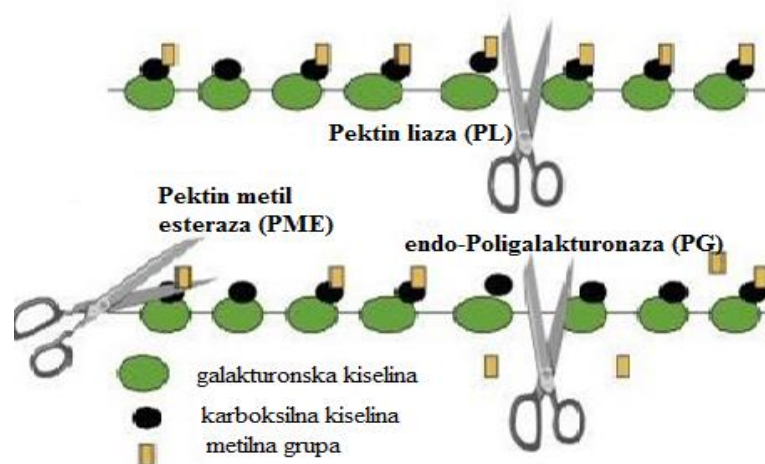
Macercijski enzimi, ovisno o upotrijebljenoj dozi enzima i sorti grožđa, potiču brže otpuštanje antocijana tijekom procesa maceracije, skraćuju vrijeme potrebno za postizanje maksimalnog ekstrakcijskog prinosa za oko 40h u usporedbi sa kontrolnim uzorcima. Omekšavanje pokožice koje se prirodno događa tijekom procesa maceracije kao rezultat degradacijskih procesa, ubrzano je korištenjem enzima. Enzimi uzrokuju degradaciju pokožice čime se olakšava otpuštanje antocijana. Njihovom upotrebom povećava se ekstrakcija antocijana, sprječava se gubitak antocijana koji se oslobađaju tijekom maceracije, te utječu na smanjenje vremena maceracije (Rio Segarde i sur., 2015).

Osim na degradaciju stanica pokožice, dodatak komercionalnih pektolitičkih enzima ima utjecaj na razvoj boje tijekom procesa maceracije. Vina kod kojih su dodani pektolitički enzimi pokazala su veći intenzitet boje u odnosu na kontrolna vina proizvedena tradicionalnim načinom vinifikacije. Razlike u intenzitetu boje između vina proizvedenih sa i bez dodatka enzima rastu kako napreduje proces maceracije, a najveća razlika je vidljiva zadnjeg dana maceracije. Kontrolna vina u desetom danu maceracije imaju niži intenzitet boje u odnosu na

vina proizvedena dodatkom enzima u sedmom danu maceracije. Upotrebom enzima skraćuje se vrijeme maceracije potrebno za dobivanje vina odgovarajućih kromatskih karakteristika. Također se ubrzava ekstrakcija fenolnih spojeva za oko 3 dana, u odnosu na kontrolna vina (Romero-Cascales i sur., 2012). S obzirom na specifičnost pektinskih spojeva na koje djeluju razlikujemo 4 vrste pektinaza (Slika 2.):

Pektin estaraza ili pektin metil esteraza (PE ili PME) kataliziraju reakcije u kojima se iz molekula pektina oslobađa metanol, a sam pektin prelazi u pektinsku kiselinu (poligalakturonska kiselina). Oslobađanje metoksi grupa se odvija postepeno jedna za drugom.

Poligalakturonaze (PG) djeluju na veze između neesterificiranih jedinica galakturonske kiseline. Mogu se javljati u endo i ekso oblicima ovisno od toga da li djeluju na unutrašnje ili vanjske veze molekula supstrata.



Slika 2. Princip aktivnosti pektolitičkih enzima, izvor: <http://goo.gl/OmgQAQ> (pristupljeno 30. lipnja 2016.)

Pektin liaze (PL) djeluju nasumice u lancu, depolimerizirajući ih na sličan način kao endo-PG, s razlikom da PL djeluju na veze između metiliranih molekula.

Pektat liaza djeluje na glikozidne veze između molekula nemetilirane galakturonske kiseline i niskometiliranog pektina. Manje se koriste u prerađi grožđa (Radovanović, 1986).

2.2.3. Tipovi maceacije

S obzirom na vrijeme provođenja postoje tri postupka maceacije (Ribereau-Gayon i sur., 2006):

1. Predfermentativni postupci
 - karbonska maceacija, termovinifikacija, kriomaceacija
2. Klasična maceacija (maceacija uz fermentaciju)
3. Postfermentativni postupci
 - može se provoditi kod crnih vina vrhunske kvalitete, produži se kontakt vina i kožice, (ponekad u kombinaciji s povećanjem temperature 30 ° C) tijekom nekoliko dana što često doprinosi kvaliteti vina

2.2.3.1. Hladna maceacija

Vina s visokim udjelom fenolnih spojeva pogotovo malvidin-3-glukozida, ioniziranih i polimeriziranih antocijana i aromatskih spojeva dobivaju se predfermentativnom maceacijom, posebno kada se koristi hladna predfermentativna maceacija. Primjenom hladne maceacije povećana je koncentracija ekstrahiranih antocijana i flavanola iz pulpe i kožice (Cheynier, 2006).

Odvija se prije alkoholne fermentacije, s ciljem povećanja kompleksnosti arome i udjela fenolnih tvari. Kako bi se omogućila vodena ekstrakcija i poboljšanje svojstava boje, masulj se tijekom hladne maceacije drži na nižim temperaturama, obično između 10 i 15°C, nekoliko dana prije početka alkoholnog vrenja. No, uz bolju ekstrakciju antocijana, poželjno je osigurati i povećanje sinteze polimeriziranih pigmenata radi stabilnosti boje vina tijekom dozrijevanja. Nažalost takvih analitičkih praćenja gotovo i nema (Sacchi i sur., 2005).

Preduga kriomaceacija, duža od 8 dana, znatno smanjuje koncentraciju polifenola u vinima dobivenim od manje zrelog grožđa. Proces predfermentativne kriomaceacije utječe na povećanje estera i acetata, kao i na povećanje izobutanola, 2-feniletanola, dietilglutarata i izoamilnog alkohola (Álvarez i sur., 2006).

2.2.3.2. Termovinifikacija

Jedna od metoda predfermentativne maceracije je termovinifikacija odnosno postupak preradbe crnog grožđa uz kraće ili duže zagrijavanje (od nekoliko minuta do nekoliko sati) dijela mošta sa svrhom da se uz povećanu temperaturu izluže bojila iz kožice. Grijanjem cijelog ili izmuljanog grožđa potiče se difuzija fenolnih spojeva iz kožice. Odvija se pri temperaturi od 65 do 75 °C, a cilj je dobiti proizvod sa većom koncentracijom fenolnih spojeva, posebno antocijana odgovornih za boju crnih vina.

Prekomjerno zagrijavanje može dovesti do povećanja gorčine uzrokovane taninima. Povećana boja mošta koja se dobije zagrijavanjem zgnječnog grožđa se pokazala dosta nestabilnom, nestaje tijekom fermentacije. Zagrijavanje masulja se može provesti uz primjenu pektolitičkih enzima koji potiču hidrolitičku razgradnju pektina pokožice grožđa (45-50 °C, ne više zbog inaktivacije pektolitičkih enzima), što omogućava lakši prijelaz antocijana i tvari arome u vino. Zagrijavanjem se uništavaju prirodni pektolitički enzimi grožđa što otežava spontano bistrenje novih vina. Međutim taj problem rješava se dodavanjem komercijalnih pektolitičkih enzima (Ribéreau-Gayon, 2006).

2.2.3.3. Karbonska maceracija

Karbonska maceracija je postupak prerade crnog grožđa kojim se ono macerira u atmosferi ugljičnog dioksida sa ciljem provođenja intracelulane fermentacije. Tijekom držanja cijelih grozdova ili bobica u atmosferi ugljičnog dioksida dolazi do lagane fermentacije zahvaljujući enzimima grožđa. Grožđe se nakon 1 ili 2 tjedna preša, dodaju se kulture selekcioniranih kvasaca i vrenje se provodi do kraja. Dobiveno vino je kratkog vijeka trajanja, te voćnog okusa.

Vina dobivena karbonskom maceracijom, u usporedbi sa standardnim vinima, imaju manju koncentraciju monomernih antocijana, no intenzitet boje je sličan zbog višeg stupnja ionizacije pigmenata (La Notte i sur., 1993). Ovakvom tehnikom dobivaju se slabija vina, s manjom koncentracijom tvari iz krutih dijelova grožđa. Blagog i podatnog su okusa, no može im nedostajati strukturalnosti. Piju se kao mlada vina, dok se u ostalim vinima konzumativna aroma stvara najmanje godinu dana nakon fermentacije (Yang i sur., 2006).

2.3. Polifenolni sastav vina

Polifenoli su skupina kemijskih spojeva koji se sastoje od hidroksilne skupine (-OH) izravno vezane na skupinu aromatskih ugljikovodika. Odgovorni su za organoleptičke karakteristike vina kao što su: boja, gorčina, trpkoca i aroma. Zbog svojih antioksidacijskih i antiupalnih svojstava polifenolni spojevi povezani su sa fenomenom nazvanim „Francuski paradoks”. Poznato je više od 8000 različitih fenolnih spojeva (Ribereau-Gayon i sur., 2006).

U grožđu i moštu javljaju se dvije osnovne grupe polifenola (Monagas i sur., 2006):

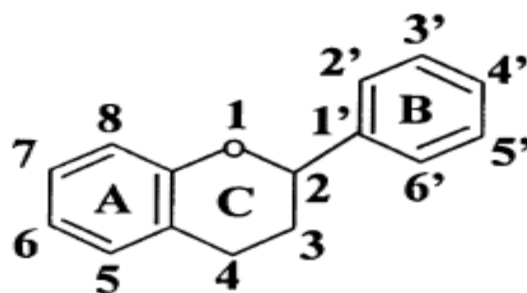
- flavonoidi (antocijani, flavanoli, flavonoli i dihidroflavonoli)
- neflavonoidi (hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina i njihovi derivati, stilbeni i fenolni alkoholi)

U samom grožđu fenoli se nalaze u pokožici, sjemenki i stabljici, a rastom vinove loze njihova se koncentracija povećava pod utjecajem sunčeve svjetlosti. Budući da se fenoli iz sjemenki sporo ekstrahiraju, glavni izvor fenola u većini vina je pokožica bobice grožđa. Povećanje sadržaja fenola vezano je za rast bobice, dok presušeno i prezrelo grožđe sadrži manje fenola. Većim su sekundarni metaboliti, topljivi u vodi koji se nalaze u vakuolama u obliku glikozida, te nisu aktivni u samom rastu vinove loze. U proizvodnji vina, procesom maceracije povećava se udio samih fenola u vinu (Robinson, 2006).

Fenolni sastav grožđa ovisi o sorti grožđa, berbi uzgoju i regiji uzgoja (Cliff i sur., 2007). Također ovisi i o grožđu koje se koristi za vinifikaciju i ekstrakciju, postupcima korištenim prilikom proizvodnje vina te kemijskim reakcijama koje se odvijaju tijekom starenja vina (Macheix, 1990).

2.3.1. Flavonoidi

Flavanoidi predstavljaju skupinu polifenolnih spojeva koji se razlikuju po kemijskoj strukturi i svojstvima. Flavonoidnu strukturu čini C₆-C₃-C₆ kostur sastavljen od dva fenolna prstena (A i B) povezanih s heterocikličkim piranskim prstenom (C prsten) (*Slika 3.*) (Moreno-Aribas i Polo, 2009).

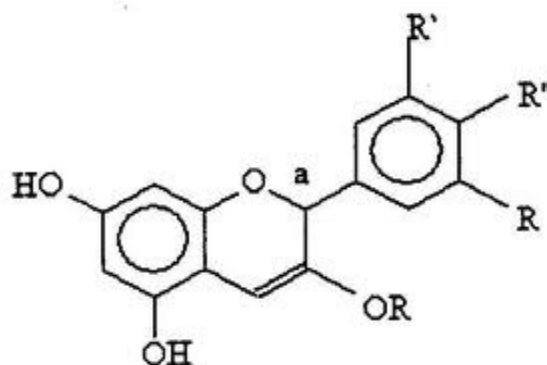


Slika 3. Osnovna struktura flavanoida (Heim i sur. 2002.)

Flavonoidi su više karakteristični za crna nego za bijela vina. U crnim vinima zauzimaju više od 85% ukupnog fenolnog sastava, dok je u bijelim vinima manje od 20% (Jackson, 2008). Svi oni mogu biti metoksilirani, hidroksilirani i glikozidirani sa monosaharidima ili oligosaharidima, a često na različitim položajima osnovne flavonoidne strukture ili glikozidnog dijela sadrže acilne skupine. Konačno, flavonoidi imaju i veliku sklonost polimerizaciji i umrežavanju (Kazazić, 2004).

2.3.1.1. Antocijani

Antocijani (grč. anthos – cvijet; kainos – plavo) su biljni pigmenti topljivi u vodi, koji procesom maceracije prelaze iz kože bobice u sok i vino, ili se nalaze i u pulpi što je karakteristika nekih sorata, tzv. bojadisara. Glavni su pigmenti crnog grožđa te su odgovorni za boju crnog vina. Razlikuju se po broju i poziciji hidroksi i metoksi skupina u B-prstenu molekule (Slika 4.).

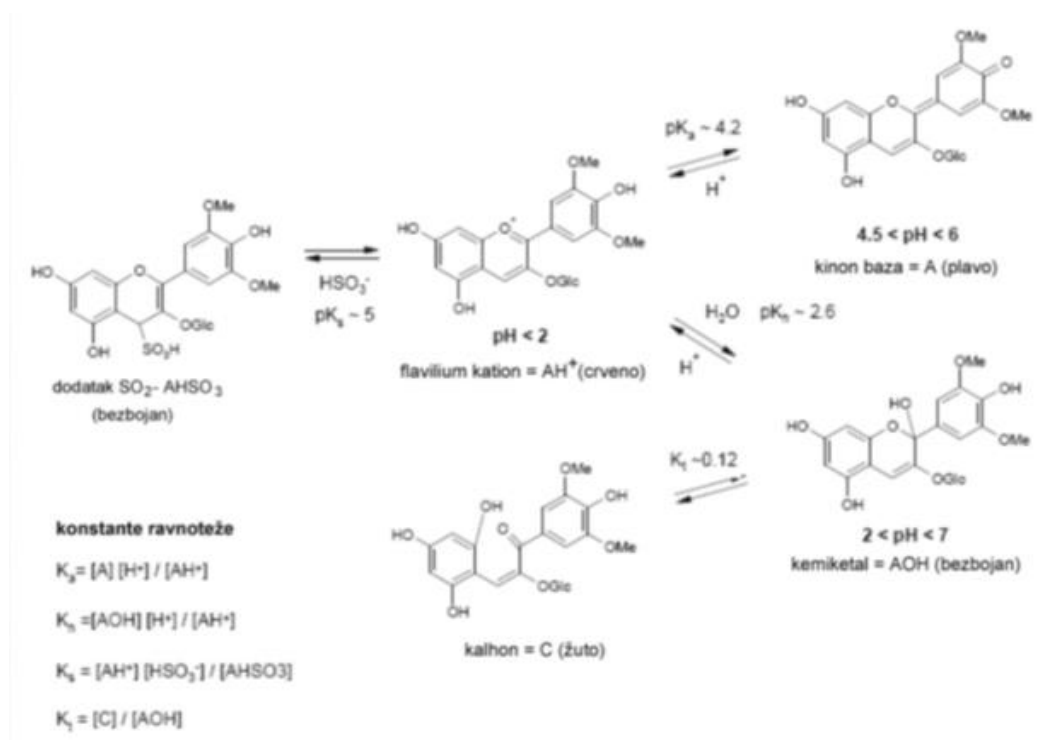


Slika 4. Strukturna formula antocijanidina ($R, R' = -H, -OH, -OCH_3$; $R'' = -OH$)

(Moreno-Arribas i Polo 2009)

Tipovi i koncentracija antocijana u crnom vinu ovise o sorti grožđa, klimatskim uvjetima, zrenju, procesu proizvodnje (korištenje enzima, uvjeti maceracije, temperatura fermentacije) i o starenju (Kelebek i sur., 2006).

Antocijani se mogu nalaziti u nekoliko različitih formi, no za boju grožđa i mladih crvenih vina odgovoran je samo crveno obojeni flavinium kation (Slika 5). U vinu ga ima manje od 10%, dok se ostali antocijani nalaze većinom u obliku kemiacetala (karbinol baza), preko hidratacije i prijenosa protona (Cheynier i dr., 2006). Dodatkom sumpornog dioksida u vino dolazi do novog ravnotežnog stanja, flavinium kation reagira s bisulfitom dajući bezbojne međuprodukte.



Slika 5. Reakcije antocijana u vinu (Moreno-Arribas i Polo, 2009)

Antocijani i njihova boja mogu se stabilizirati kopigmentacijom ili njihovom pretvorbom u mnogo stabilnije pigmente različitim reakcijama kondenzacije koje se odvijaju tijekom procesa vinifikacije (Moreno-Arribas i Polo, 2009). O kopigmentaciji ovisi ravnoteža između obojenih i bezbojnih oblika antocijana, čime se stabilizira crvena flavinium forma kroz proces kopigmentacije, i tako se omogućava da veći udio antocijana bude u obojenoj flavinium formi.

2.3.1.2. Proantocijanidini (kondenzirani tanini)

Proantocijanidini su oligomeri i polimeri flavanola koji nastaju polimerizacijom flavan-3-ola. Starenjem vina ulaze u reakcije sa monomernim flavonoidima te stvaraju polimere (tanine). Količina tanina u vinu ovisi o sorti grožđa, o starosti i kontaktu s bačvom, kao i o trajanju kontakta pokožica i sjemenki sa moštom. Bijela vina nemaju tanina ili ih imaju u malim količinama (Jackson, 2008).

Tanini imaju sposobnost reakcija i interakcija sa proteinima i mogućnost taloženja proteina (Moreno-Arribas i Polo, 2009).

Prvenstveno utječu na osjet trpkocće u crnim vinima zbog vezanja na proteine sline. Sudjeluju u kemijskim i enzimatskim reakcijama oksidacije i posmeđivanja vina, te brojnim reakcijama kondenzacije tijekom proizvodnje i dozrijevanja vina. Stvaraju nove pigmente u reakcijama sa antocijanima tijekom dozrijevanja vina, koji zbog svoje stabilnosti osiguravaju i stabilnost boje vina (Cheynier i dr., 2006).

2.3.2. Neflavanoidi

Neflavonoidni spojevi čine glavninu fenolnog sastava bijelih vina, zbog izostanka ili vrlo kratke maceracije tijekom koje dolazi do ekstrakcije flavonoida. Neflavonoidi imaju C_1C_6 ili C_3C_6 strukturu, što znači da je na primarni benzenov prsten vezani jedan ili tri ugljikova atoma. Osnovna podjela neflavonoidnih spojeva u vinu je na hidroksibenzojeve kiseline i hidroksicimetne kiseline, a u manjim koncentracijama nalaze se još i hlapljivi fenolni spojevi, lignani, stilbeni i kumarini.

Iako su neflavonoidni spojevi nebojeni, u intra- i inter-molekularnim reakcijama stabiliziraju i pojačavaju boju crnih vina (Moreno-Arribas i Polo, 2009).

Neflavonoidi u grožđu sintetiziraju se iz fenilalanina, dok oni koji potječu iz kvasaca koji proizlaze iz acetatne kiseline. Prisutni su u staničnim vakuolama pokožice i pulpe, a prilikom muljanja grožđa se vrlo lako ekstrahiraju (Jackson, 2008).

2.4. Metode mjerenja boje

Mogućnost mjerenja boje daju kolorimetrijske metode (Hunter i Harold, 1987). Pomoću kolorimetra se dobiju numeričke vrijednosti kojima se boja definira u skladu s međunarodnim standardima. Primjena kolorimetara omogućava brzo dobivanje vrijednosti za svaku pojedinu boju (Konica Minolta, 2011). Jedan od poznatijih kolorimetara je Hunterov (1942) koji je po principu rada fotoelektrični tristimulusni kolorimetar. Radi na principu pretvorbe energije iz uzorka pomoću filtera (koji aproksimiraju boju promatrača) u konačnu psihofizikalnu funkciju (boju). Na taj način se stimulira matematički proračun boje preko filtera (crveni, zeleni, plavi) da bi se dobio jeftiniji i brži način računanja tristimulusnih vrijednosti. Razvijena boja se može opisati Hunterovim L, a i b vrijednostima (Hunter i Harold, 1987). L, a* i b* prostorna boja (također se spominje kao CIELAB) je trenutno jedna od najpopularnijih prostornih boja za mjerenje boje. To je jedna od jednoličnih prostornih boja definirana CIE-om (Međunarodna komisija za svjetlo i rasvjetu) kako bi se smanjio jedan od najvećih problema izvorne Xyz prostorne boje, tj. da jednaka udaljenost na x, y dijagramu zasićenosti ne odgovara na jednake razlike u boji. U toj prostornoj boji a* i b* su koordinate kromatičnosti, odnosno a* ukazuje na intenzitet crvene ili zelene boje, a b* vrijednost na intenzitet žute ili plave boje, dok L* vrijednost ukazuje na intenzitet boje. Osim te tri vrijednosti prostorne boje postoje i L*C*H prostorne boje koje koriste isti dijagram kao L*a*b, ali umjesto pravokutnih koriste cilindrične koordinate. U ovom prostoru boja L* ukazuje na intenzitet, C* je boja, a H vrijednost kuta. Vrijednost boje C* je 0 u sredini i povećava se od centra.

Drugu mogućnost mjerenja boje daje spektrofotometar. To je uređaj koji mjeri promjene u refleksiji, transmisiji ili zračenju, u intervalima, duž valnih duljina vidljivog dijela spektra. Spektrofotometrijska krivulja se dobiva kao rezultat mjerenja faktora refleksije ili transmisije u pojedinim valnim područjima (intervalima). Rad uređaja se temelji na rastavljanju bijelog svjetla na intervale valnih duljina pomoću mono-kromatora. Ispitivani uzorak boje i bijeli standard (najčešće MgO) se osvjetljava pojedinačnim valnim dužinama izdvojenim monokromatorom. Postupak se provodi redom s monokromatskim svjetlima duž čitavog spektra. Reflektirano svjetlo fotoćelija pretvara u električne impulse koji se dalje preračunavaju tako da se na skali mogu očitati faktor refleksije ili transmisije, pri određenoj valnoj dužini, u odnosu na bijeli standard. Spektrofotometar može podnijeti metametriju, pojavu kada se dva objekta doimaju istima pod jednom svjetlošću, a drugačije pod drugom (Konica Minolta, 2011).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

Provođenje pokusa. Za provođenje pokusa odabrane su dvije autohtone sorte crnog grožđa s područja Kaštela (Babica i Crljenak kaštelanski). Pokusi su postavljeni u poluindustrijskom mjerilu, a za svaki tretman odabrano je po 100kg grožđa. Nakon muljanja i ruljanja u dobivene masulje dodan je kvasac SIHA Aktivhefe 8 (Begerow) u količini od 25g/hl. Provedena je klasična fermentacija proizvedenog masulja, fermentacija sa dodatkom enzima Vinozym Vintage FCE (Novozymes - poligalakturonaza) i fermentacija sa dodatkom enzima Sihazym Extro (Begerow - poligalakturonaza, sekundarno arabinozidaza i hemicelulaza). Komercijalni enzimski preparati dodani su u količini od 5g/100kg grožđa. Fermentacije su provedene s potopljenim klobukom u PVC posudama, pri sobnoj temperaturi. Uzorci su izuzimani nakon muljanja, tijekom vrenja te nakon prvog i drugog pretoka. Vrijeme izuzimanja i oznake uzoraka prikazane su u tablicama 1. i 2.

Tablica 1. Vrijeme izuzimanja i oznake uzoraka za sortu Babica

Datum uzimanja uzorka	Vinificirano grožđe sorte Babica (B)			Opaske
	Opis uzorka			
	Bez enzima (A)	Enzim Vinozym Vintage FCE (B)	Enzim Sihazym Extro (C)	
18.09.2015.	B ₀ prije dodavanja SO ₂			Muljanje Maceracija
18.09.2015.	B ₀ nakon dodavanja SO ₂			Maceracija
19.09.2015.	BA1	BB1	BC1	Maceracija
20.09.2015.	BA2	BB2	BC2	Maceracija
21.09.2015.	BA3	BB3	BC3	Maceracija
22.09.2015.	BA4	BB4	BC4	Maceracija
23.09.2015.	BA5	BB5	BC5	Maceracija
23.09.2015.	Razdvajanje čvrste i tekuće faze - mlado vino stavljeno u inoks posude zatvorene s vrenjačom			
30.10.2015.	BA6	BB6	BC6	Prvi pretok
02.04.2016.	BA7	BB7	BC7	Drugi pretok

Tablica 2. Vrijeme izuzimanja i oznake uzoraka za sortu Crljenak kaštelanski

Datum uzimanja uzorka	Vinificirano grožđe sorte Crljenak kaštelanski (Z)			Opaske
	Opis uzorka			
	Bez enzima (A)	Enzim Vinozym Vintage FCE (B)	Enzim Sihazym Extro (C)	
10.09.2015.	Z ₀ prije dodavanja SO ₂			Muljanje Maceracija
10.09.2015.	Z ₀ nakon dodavanja SO ₂			Maceracija
11.09.2015.	ZA1	ZB1	ZC1	Maceracija
12.09.2015.	ZA2	ZB2	ZC2	Maceracija
13.09.2015.	ZA3	ZB3	ZC3	Maceracija
14.09.2015.	ZA4	ZB4	ZC4	Maceracija
15.09.2015.	ZA5	ZB5	ZC5	Maceracija
15.09.2015.	Razdvajanje čvrste i tekuće faze - mlado vino stavljeno u inoks posude zatvorene s vrenjačom			
19.10.2015.	ZA6	ZB6	ZC6	Prvi pretok
23.03.2016.	ZA7	ZB7	ZC7	Drugi pretok

3.2. Metoda rada

Određivanje kolorimetrijskih karakteristika vina

Aparatura i pribor:

- Kiveta
- Kolorimetar

Aparatura: Kolorimetrijsko određivanje boje provedeno je pomoću kolorimetra (Konica Minolta), čime se dobivaju numeričke vrijednosti za pojedine karakteristike boje. Princip rada ovog kolorimetra bazira se na fotoelektričnoj refleksijskoj kolorimetriji. Uređaj sadrži fotoćelije ispod kojih su postavljeni različiti RGB filteri. Odgovarajuća količina napona se inducira prolaskom svjetlosti različitih valnih duljina kroz filtre iz čega se dobivaju različite brojčane vrijednosti gore navedenih koordinata. Na ovaj način kolorimetar pretvara svjetlosnu energiju, kojom osvjetljavamo uzorke, u objektivno izmjerenu boju.

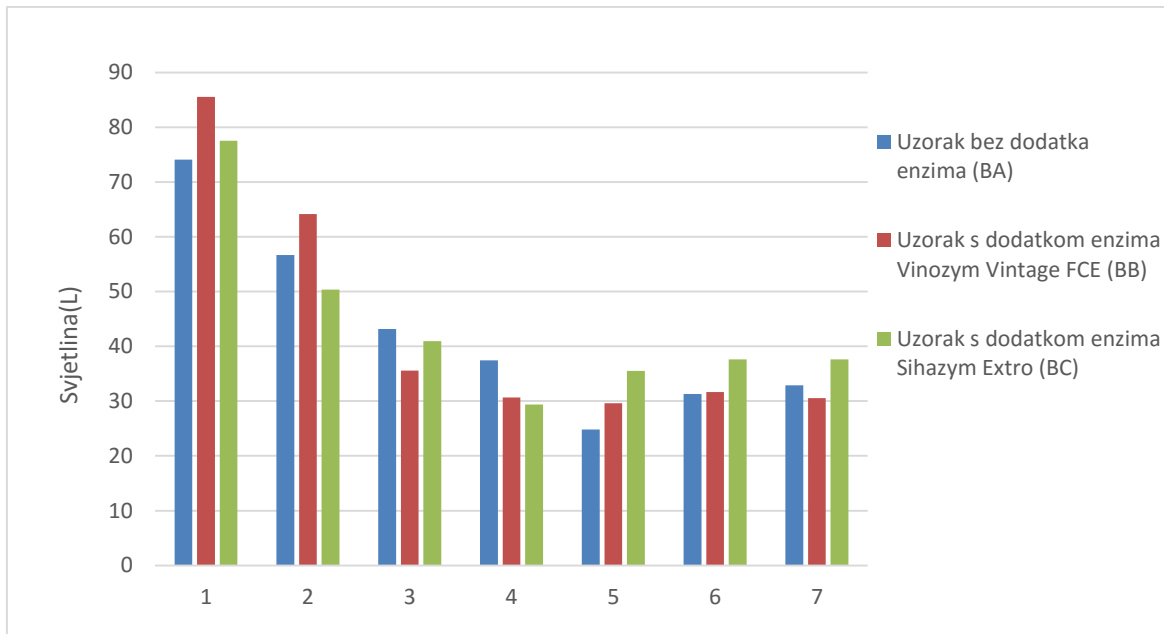
U ovom istraživanju korišten je CIELAB (Commission Internationale de l'Éclairage LAB) prostor boje koji sferičnu površinu, odnosno kuglu zatvara sa svoje tri koordinate (L, a*, b*). Primjenu CIELAB-a za određivanja boje vina, predložila je Međunarodna komisija za osvjetljenje. Ova se metoda temelji na mjerenju tri dimenzije u prostoru boje. Numeričke vrijednosti su pridružene trodimenzionalnim koordinatama nijansi boja u rasponu su od +a (crvena) do -a (zelen), +b (žuta) do -b (plava), dok koordinata L predstavlja svjetlinu u rasponu od 0 (crna) do 100 (bijela). Intenzitet boje predstavlja količinu boje koja se znatno mijenja ovisno o vrsti vina odnosno sorti grožđa. Vrijednost C opisuje intenzitet (zasićenost) boje pri čemu veće vrijednosti predstavljaju intenzivnije, a niže vrijednosti pastelnije boje. CIELAB prostor boje definira i H vrijednost koja pokazuje ton boje asociran s rasponom stupnjeva (0-90° crvenopurpurna, 90-180° žuta, 180-270° plavozelena, 270-360° plava boja). (Konica Minolta, 2011).

Postupak određivanja:

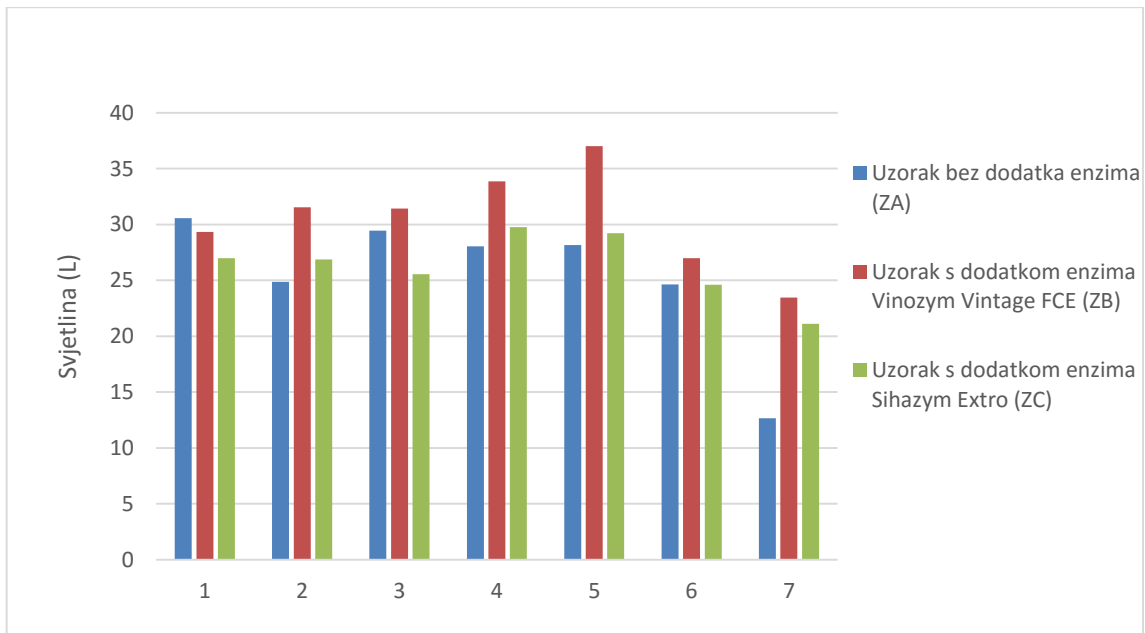
Priprema uzorka: Bistri uzorak se ulije u kivetu, a vanjske stijenke kivete se po potrebi obrišu staničevinom i potom se kiveta unosi u odgovarajuće kućište kolorimetra. Zatim se pritiskom na odgovarajuću tipku pristupa mjerenju, a dobivene vrijednosti za kolorimetrijske karakteristike uzoraka, dobiju se u vidu elektroničkog zapisa.

Postupkom od dva mjerenja određuju se vrijednosti kolorimetrijskih koordinata nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

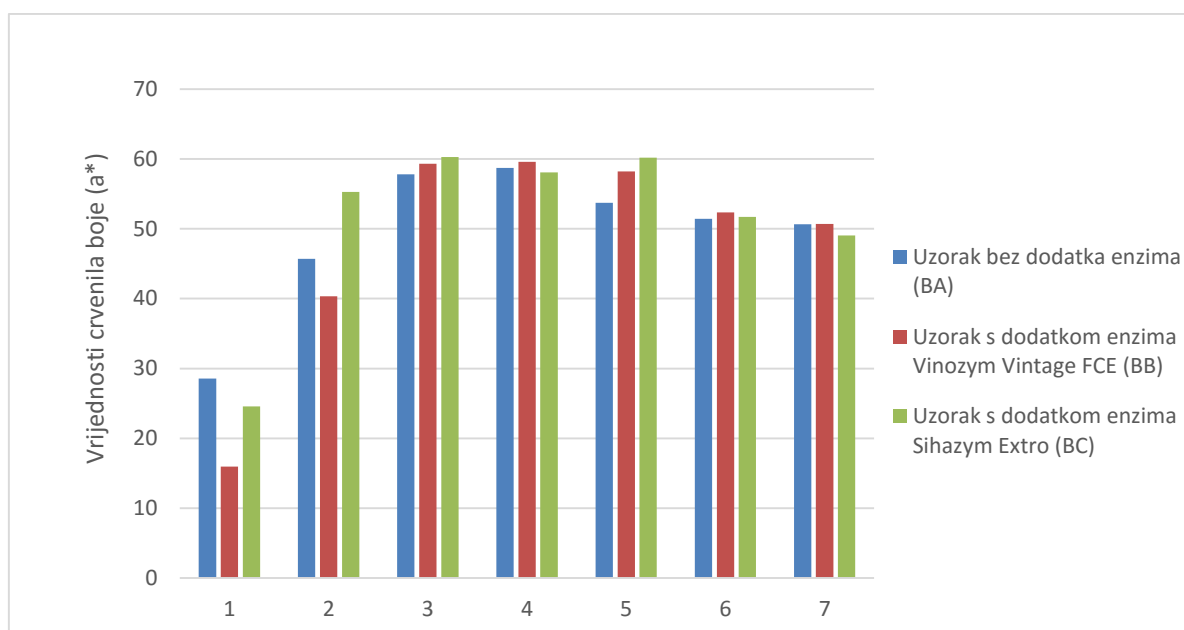
4. REZULTATI



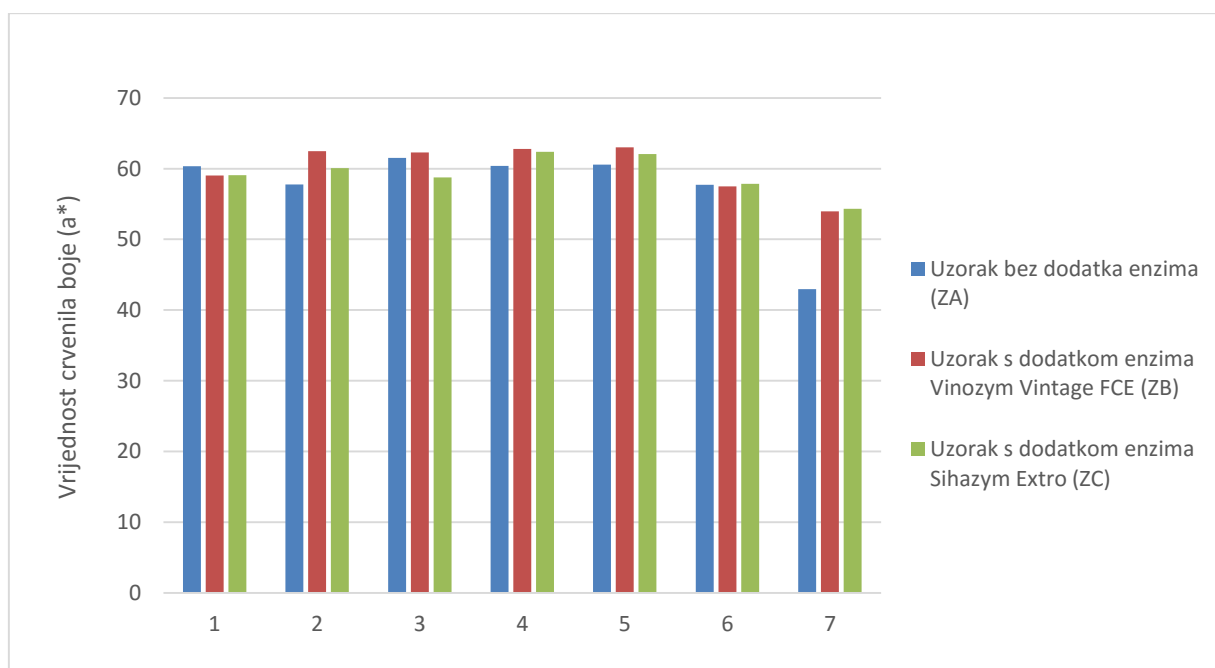
Slika 6. Grafički prikaz vrijednosti svjetline (L) mjereno u uzorcima sorte Babica (BA, BB i BC) tijekom fermentacije (1-5), te nakon prvog (6) i drugog pretoka (7)



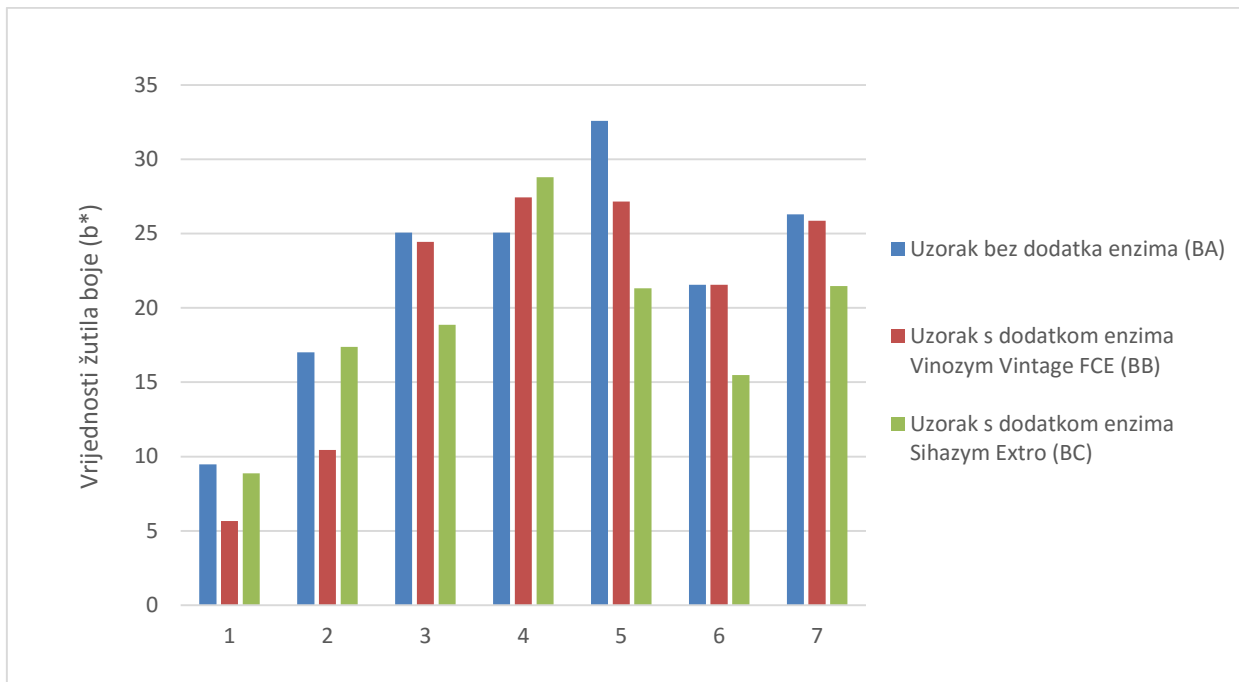
Slika 7. Grafički prikaz vrijednosti svjetline (L) mjereno u uzorcima sorte Crljenak kaštelanski (ZA, ZB i ZC) tijekom fermentacije (1-5), te nakon prvog (6) i drugog pretoka (7)



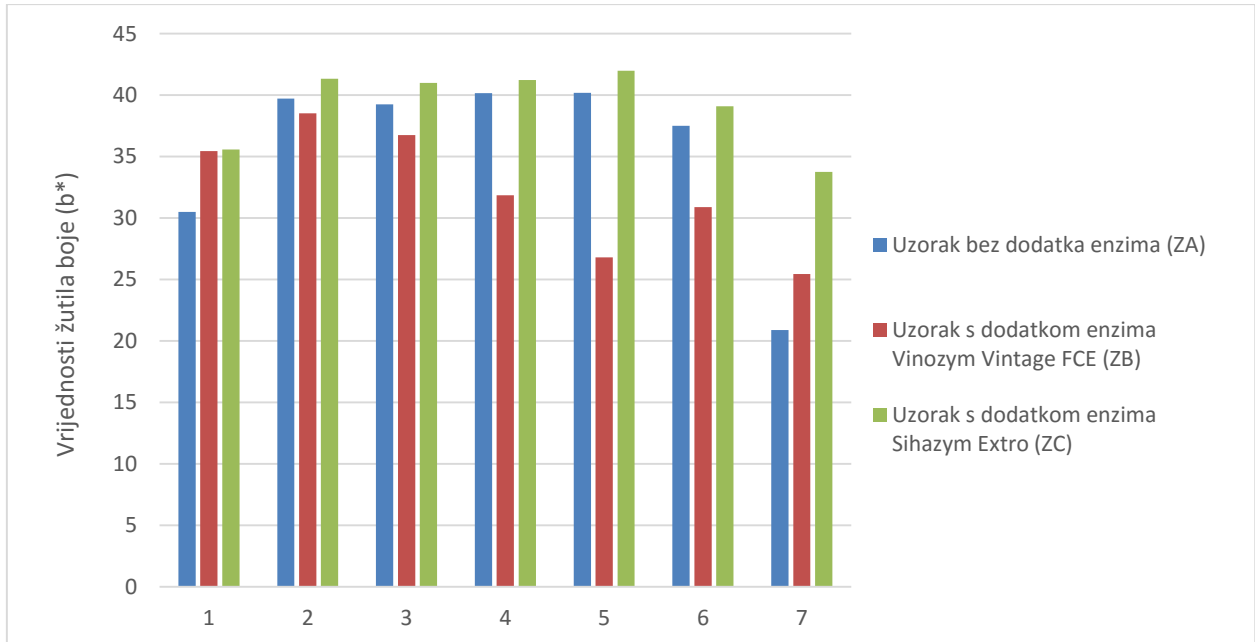
Slika 8. Grafički prikaz vrijednosti crvenila boje (a^*) mjereno u uzorcima sorte Babica (BA, BB i BC) tijekom fermentacije (1-5), te nakon prvog (6) i drugog pretoka (7)



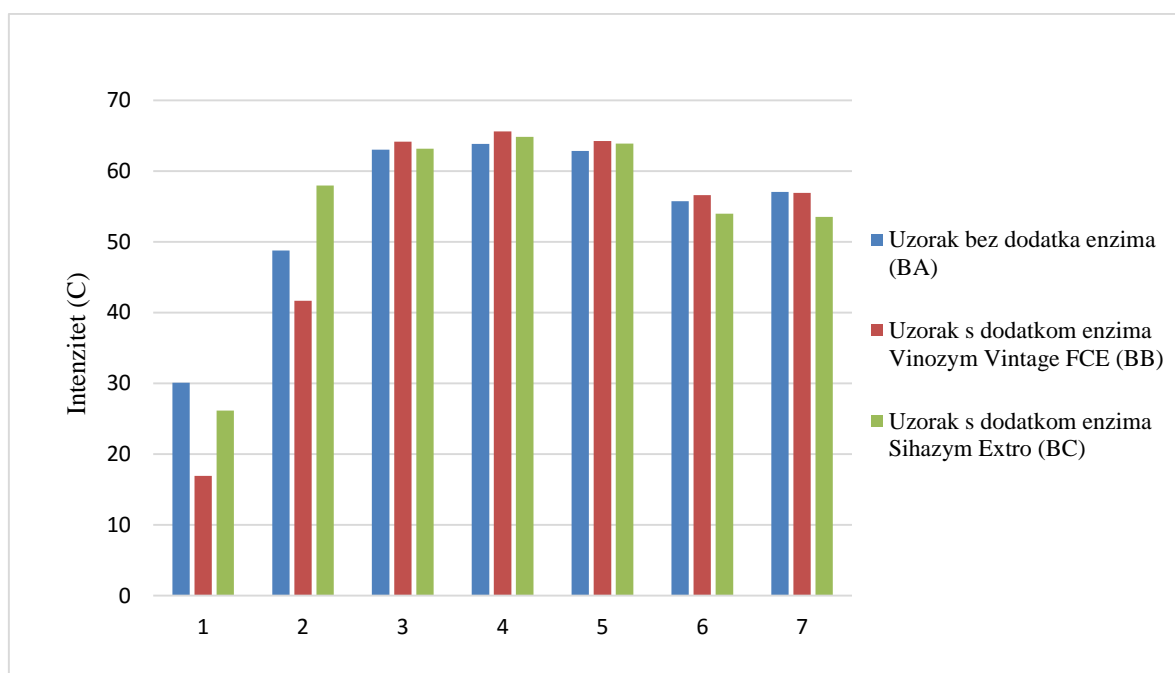
Slika 9. Grafički prikaz vrijednosti crvenila boje (a^*) mjereno u uzorcima sorte Crljenak kaštelanski (ZA, ZB i ZC) tijekom fermentacije (1-5), te nakon prvog (6) i drugog pretoka (7)



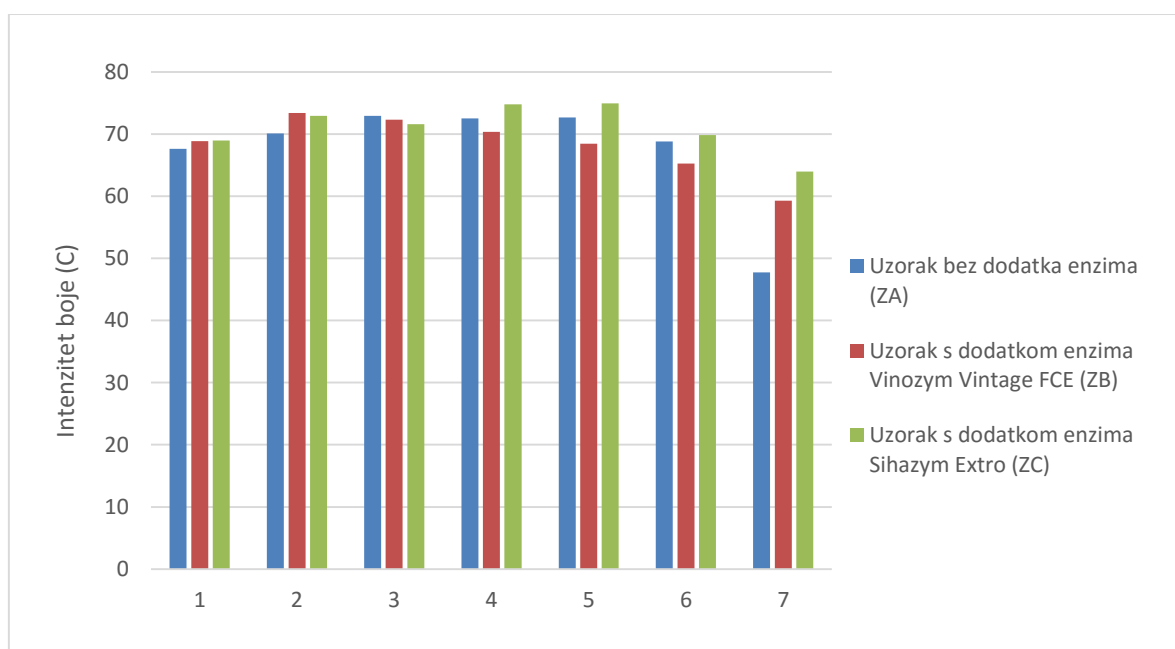
Slika 10. Grafički prikaz vrijednosti žutila boje (b^*) mjerjen u uzorcima sorte Babica (BA, BB i BC) tijekom fermentacije (1-5), te nakon prvog (6) i drugog pretoka (7)



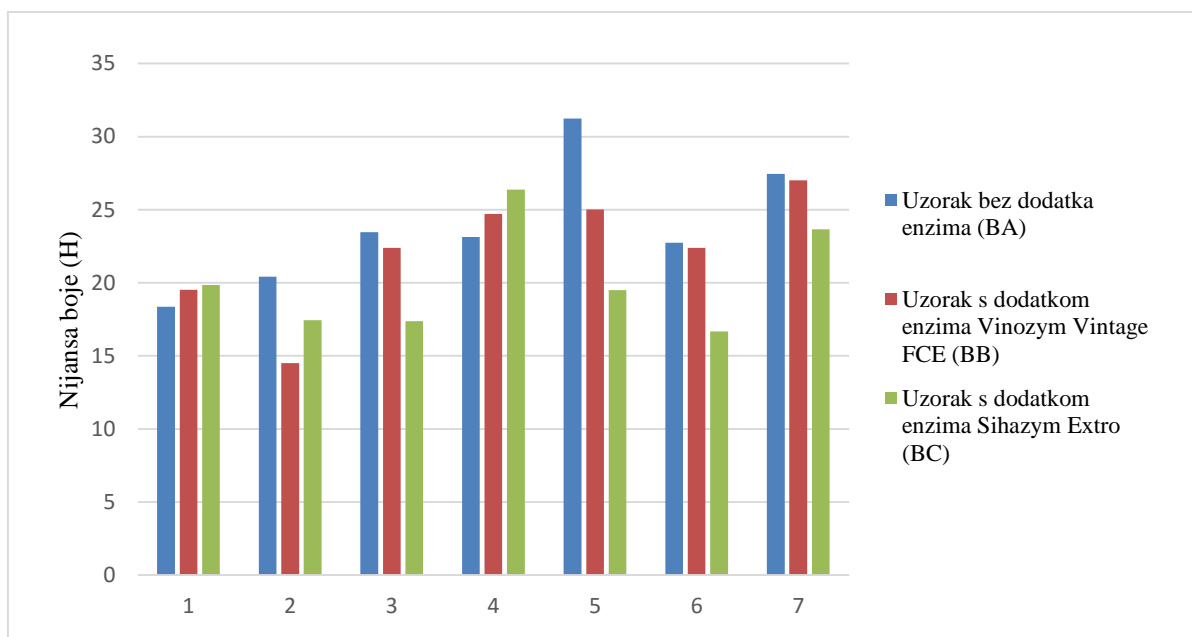
Slika 11. Grafički prikaz vrijednosti žutila boje (b^*) mjerjen u uzorcima sorte Crljenak kaštelanski (ZA, BB i ZC) tijekom fermentacije (1-5), te nakon prvog (6) i drugog pretoka (7)



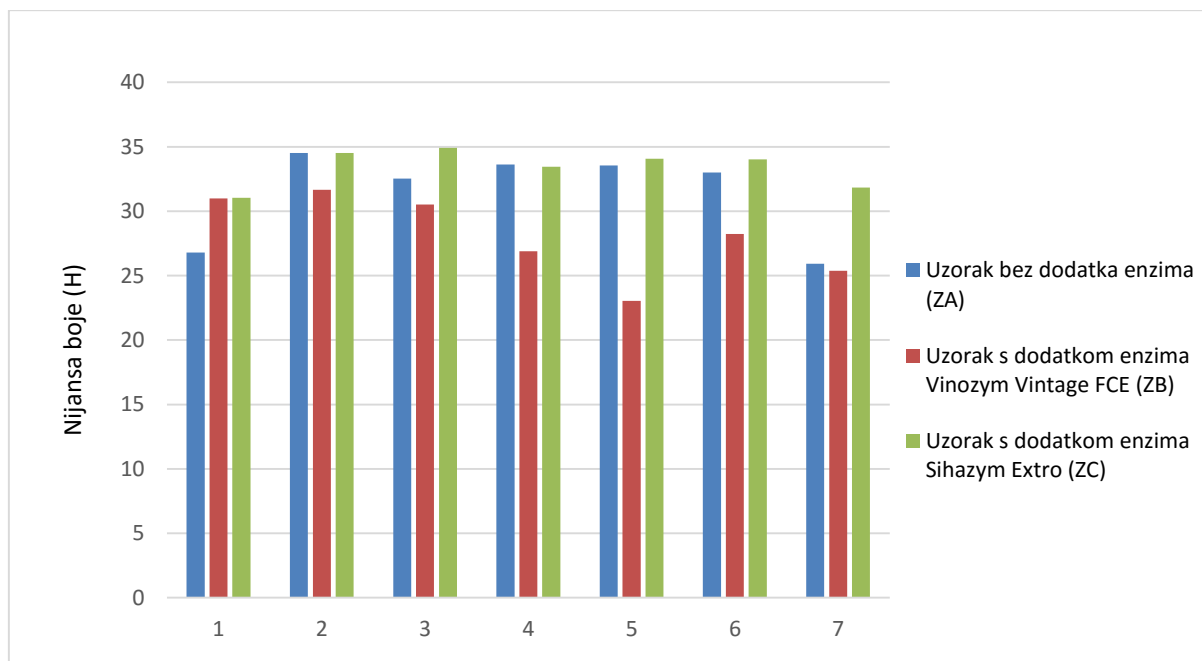
Slika 12. Grafički prikaz vrijednosti intenziteta boje (C) mjereno u uzorcima sorte Babica (BA, BB i BC) tijekom fermentacije (1-5), te nakon prvog (6) i drugog pretoka (7)



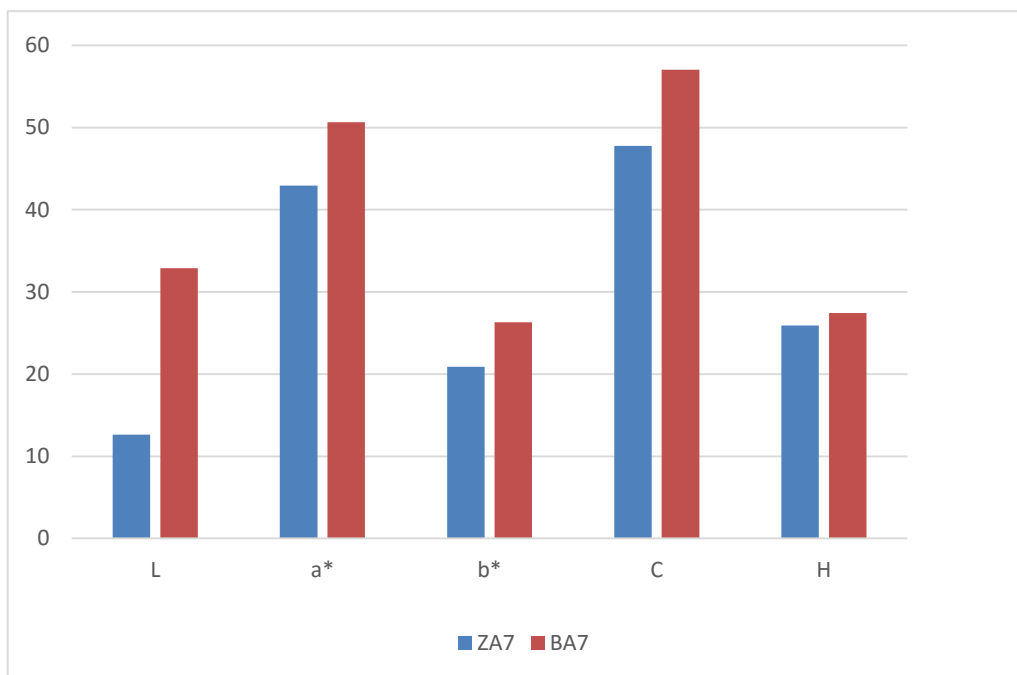
Slika 13. Grafički prikaz vrijednosti intenziteta boje (C) mjereno u uzorcima sorte Crljenak kaštelanski (ZA, ZB i ZC) tijekom fermentacije (1-5), te nakon prvog (6) i drugog pretoka (7)



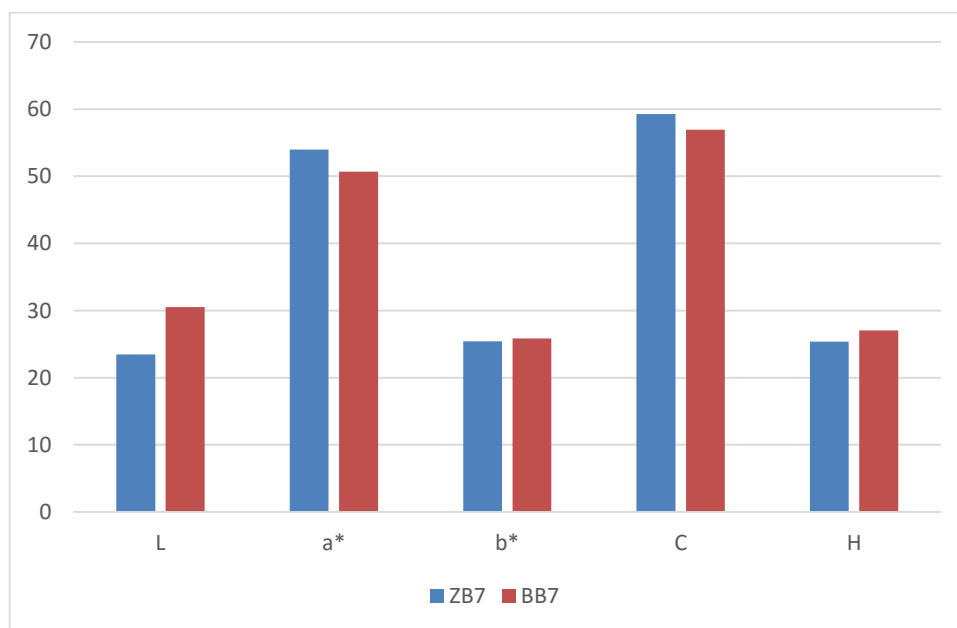
Slika 14. Grafički prikaz vrijednosti nijanse boje (H) mjereno u uzorcima sorte Babica (BA, BB i BC) tijekom fermentacije (1-5), te nakon prvog (6) i drugog pretoka (7)



Slika 15. Grafički prikaz vrijednosti nijanse boje (H) mjereno u uzorcima sorte Crljenak kaštelanski (ZA, ZB i ZC) tijekom fermentacije (1-5), te nakon prvog (6) i drugog pretoka (7)

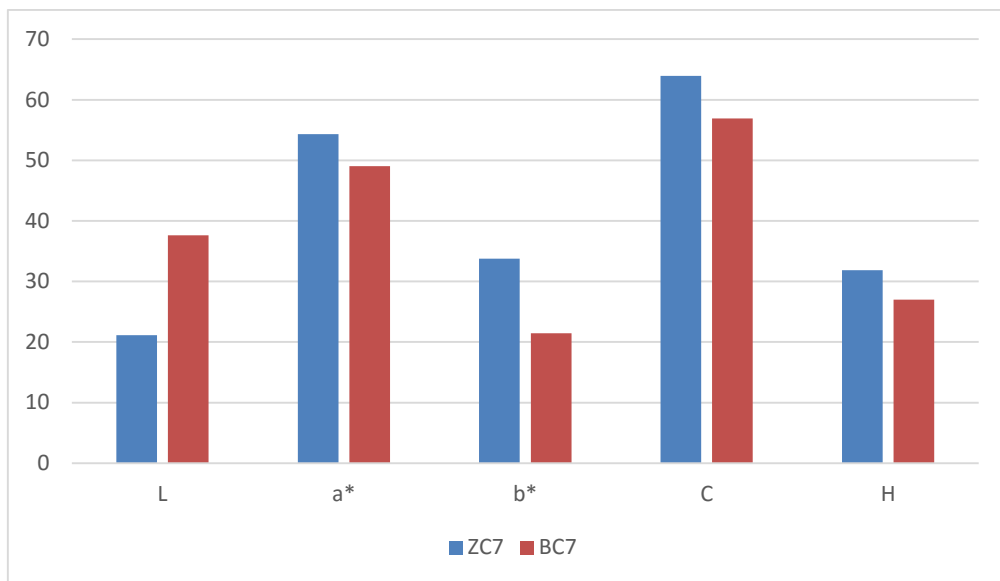


Slika 16. Prikaz vrijednosti L, a*, b*, C i H između dviju sorti Babice (BA7) i Crljenka kaštelanskog (ZA7) nakon drugog pretoka u uzorcima bez dodatka enzima



Slika 17. Prikaz vrijednosti L, a*, b*, C i H između dviju sorti Babice (BB7) i Crljenka kaštelanskog (ZB7) nakon drugog pretoka u uzorcima sa dodanim enzimom Vinozym Vintage

FCE



Slika 18. Prikaz vrijednosti L, a*, b*, C i H između dviju sorti Babice (BC7) i Crljenka kaštelanskog (ZC7) nakon drugog pretoka u uzorcima sa dodanim enzimom Sihazym Extro

5. RASPRAVA

Kolorimetrijske karakteristike su određene CIELAB parametrima boje. Koncentracija antocijana povezana je sa parametrom a^* , tonom boje H i svjetlinom L. Visoke vrijednosti a^* i niske vrijednosti H posljedica su visoke količine antocijana te starosti vina (Cliff i sur., 2006). Vrijednost L se smanjuje kako boja postaje tamnija (Tosun i sur., 2007). Intenzitet C je parametar koji pokazuje doprinos a^* i b^* ili intenzitet crvene i žute (Gil-Munoz i sur., 1997). Grafički prikazi kolorimetrijskih karakteristika ispitivanih uzoraka prikazani su na slikama 6-18. Numeričke vrijednosti se nalaze u Prilozima 1. i 2.

Uspoređujući svjetlinu boje (L) kod uzoraka proizvedenih od sorte Babica iz grafičkog prikaza prikazanog na Slici 6. vidimo da dolazi do pada vrijednosti svjetline 1.-4. dana alkoholne fermentacije, a nakon prvog i drugog pretoka nije došlo do značajnih promjena. Za crna vina je karakteristično da imaju niže vrijednosti svjetline boje (L), budući da vrijednost L predstavlja svjetlinu boje u rasponu od 0 (crna) do 100 (bijela) (Konica Minolta, 2011). S obzirom na dodatak enzima u uzorku u kojem se fermentacija odvijala uz dodatak enzima Vinozym Vintage FCE, tijekom prva dva dana alkoholne fermentacije došlo je do povećanja vrijednosti svjetline, a tijekom 3. i 4. dana fermentacije vrijednost svjetline je smanjena u odnosu na uzorak bez dodatka enzima. U konačnici dodatak enzima Vinozym Vintage FCE je utjecao na smanjenje svjetline konačnog proizvoda. U uzorku u kojem se fermentacija odvijala uz dodatak enzima Sihazym Extro vrijednost svjetline od 2. do 4. dana alkoholne fermentacije je bila manja u odnosu na uzorke bez dodatka enzima, a nakon petog dana fermentacije vrijednost svjetline raste te ostaje ista nakon prvog i drugog pretoka. Iako je kod svih tretmana došlo do smanjenja svjetline, kao posljedice ekstrakcija tijekom maceracije, mlado vino s enzimom Sihazym Extro pokazalo je nešto izraženiju vrijednost svjetline.

Kod uzoraka proizvedenih od sorte Crljenak kaštelanski vrijednost svjetline počinje značajnije opadati tek nakon prvog i drugog pretoka (Slika 7). U uzorcima u kojima se fermentacija odvijala uz dodatak enzima Vinozym Vintage FCE i enzima Sihazym Extro nakon prvog i drugog pretoka zabilježeno je značajno povećanje vrijednosti svjetline boje u odnosu na uzorke kod kojih je provedena klasična maceracija bez dodatka enzima.

Numeričke vrijednosti a^* kreću se od +a (crvena) do -a (zelena). Za b^* taj raspon je od +b (žuta) do -b (plava) (Konica Minolta, 2011). Budući da su i Babica i Crljenak kaštelanski crne sorte grožđa jasno je da ni jedna a^* vrijednost ne teži minusu. Sve b^* vrijednosti su također pozitivne. Vina sa većom vrijednosti parametra a^* imaju nižu vrijednost parametra b^* .

Kod svih uzoraka sorte Babica vrijednost crvenila boje (a^*) raste kako se odvija alkoholna fermentacija, a nakon 1. i 2. pretoka lagano opada (Slika 8.). Nema znatnih razlika među uzorcima, osim tijekom 1. i 2. dana fermentacije. Nakon prvog dana fermentacije uzorci koji su tretirani enzimom Vinozym Vintage FCE i enzimom Sihazym Extro imaju nižu vrijednost crvenila boje (a^*) u odnosu na uzorak bez dodatka enzima, a nakon drugog dana uzorak u kojem se fermentacija odvijala uz dodatak enzima Vinozym Vintage FCE pokazao je veću vrijednost a^* . U konačnici dodatak enzima Vinozym Vintage FCE i enzima Sihazym Extro nije utjecao na promjenu vrijednosti crvenila boje (a^*). U svim uzorcima sorte Crljenak kaštelanski nisu pokazane značajne promjene vrijednosti crvenila boje (a^*) tijekom prvih pet dana alkoholne fermentacije, te nakon prvog pretoka (Slika 9). Nakon drugog pretoka zabilježen je značajniji pad vrijednosti a^* u uzorku u kojem se fermentacija odvijala bez dodataka enzima. U konačnici dodatak i jednog i drugog enzima utjecao je na povećanje vrijednosti crvenila boje, što znači da su pektolitički enzimi doprinijeli boljoj ekstrakciji antocijana, pigmenta odgovornih za boju crnog vina.

Iz grafičkog prikaza vrijednosti žutila boje (b^*) prikazanog na Slici 10. vidimo da vrijednost b^* u svim uzorcima sorte Babica, raste kako se odvija alkoholna fermentacija, nakon čega opada, te ponovno raste nakon drugog pretoka. S obzirom na dodatak enzima u uzorku u kojem se fermentacija odvijala uz dodatak enzima Vinizym Vintage FCE, vrijednost žutila boje tijekom prva dva dana fermentacije je bila najniža, dok je nakon trećeg dana fermentacije došlo do njezinog porasta u odnosu na uzorak tretiran enzimom Sihazym Extro. U konačnici dodatak enzima Vinizym Vintage FCE nije značajno utjecao na promjenu vrijednosti žutila boje. Kod uzorka s dodatkom enzima Sihazym Extro, vrijednost žutila boje (b^*) je na kraju fermentacije, te nakon prvog i drugog pretoka bila najniža u odnosu na uzorak bez dodatka enzima. Drugačiji rezultati vrijednosti žutila boje dobiveni su u uzorcima sorte Crljenak kaštelanski (Slika 11). U uzorku u kojem se fermentacija odvijala uz dodatak enzima Sihazym Extro dolazi do laganog povećanja vrijednosti b^* kako se odvija alkoholna fermentacija, a nakon prvog pretoka vrijednost b^* lagano pada. Nakon prvog i drugog pretoka ovaj uzorak je pokazao najveću vrijednost. Kod uzorka s dodatkom enzima Vinizym Vintage FCE, vrijednost žutila boje je na kraju fermentacije i nakon prvog pretoka bila najniža dok je nakon drugog pretoka došlo do porasta u odnosu na uzorak bez dodatka enzima. Dakle dodatak enzima pozitivno je utjecao na žutinu boje konačnog proizvoda.

Rezultati određivanja intenziteta boje (C) u uzorcima bez dodatka enzima, sa dodatkom enzima Vinozym Vintage FCE i sa dodatkom enzima Sihazym Extro, za dvije različite sorte Babica i Crljenak kaštelanski prikazani su na slikama 12 i 13. Kod svih uzoraka sorte Babica intenzitet boje raste kako se odvija alkoholna fermentacija, a nakon 1. i 2. pretoka lagano opada. Nema znatnih razlika među uzorcima, osim tijekom 1. i 2. dana fermentacije gdje uzorak koji je tretiran enzimom Vinozym Vintage FCE ima najniži intenzitet.

Kod uzoraka proizvedenih od sorte Crljenak kaštelanski nema značajnih razlika u prva tri dana, dok a nakon fermentacije dolazi do laganog smanjenja. S obzirom na dodatak enzima u uzorku u kojem se fermentacija odvijala uz dodatak enzima Sihazym Extro četvrtog dana fermentacije dolazi do porasta intenziteta boje. Nakon prvog i drugog pretoka je ovaj uzorak također pokazao najveću vrijednost. Kod uzorka s dodatkom enzima Vinizym Vintage FCE, intenzitet boje je na kraju fermentacije i nakon prvog pretoka bio najniži dok je nakon drugog pretoka došlo do njegovog porasta u odnosu na uzorak bez dodatka enzima. Dakle dodatak enzima pozitivno je utjecao na intenzitet boje konačnog proizvoda.

Više vrijednosti b^* u skladu su i s visokim vrijednostima tona H kod pojedinih uzoraka. Istraživanje Gil-Muñoza i suradnika (1998) pokazalo je da su, zahvaljujući žutim pigmentima, vrijednosti H visoke. Rezultati određivanja nijanse (tona) boje (H) u uzorcima bez dodatka enzima, sa dodatkom enzima Vinozym Vintage FCE i sa dodatkom enzima Sihazym Extro za dvije različite sorte, Babica i Crljenak kaštelanski, prikazani su na slici 14. i 15. Kod uzoraka sorte Babica nijansa boje (H) raste kako se odvija alkoholna fermentacija, nakon čega opada, te nakon drugog pretoka lagano raste. Dodatak enzima utjecao je na neznatno smanjenje tona boje. S druge strane između uzoraka sorte Crljenak kaštelanski dodatak enzima Sihazym Extro utjecao je na povećanje, a dodatak enzima Vinozym Vintage FCE na smanjenje tona boje (H) u odnosu na uzorke kod kojih je provedena klasična fermentacija bez dodatka enzima.

Na slikama 16, 17, i 18 prikazane su vrijednosti L, a^* , b^* , C i H između dviju sorti, Babice i Crljenka kaštelanskog nakon drugog pretoka bez dodatka enzima, sa dodatkom enzima Vinozym Vintage FCE i s dodatkom enzima Sihazym Extro. Iz Slike 16 uočljivo je da su vrijednosti L, a^* , b^* , C i H. kod sorte Babica puno niže pogotovo L i b^* u odnosu na uzorke sorte Crljenak kaštelanski. Iako su uočene razlike u dobivenim rezultatima ispitivanih parametara u ove dvije sorte teško je donositi zaključke o njihovoj različitosti s obzirom na veliki broj drugih čimbenika koji utječu na fenolni potencijal grožđa u trenutku berbe. Neki

autori povezuju visoke koncentracije različitih polifenolnih parametara kod pojedinih sorata, s primarnim svojstvima grozda, odnosno vrlo visokim odnosom krutih dijelova bobice u odnosu na meso bobice (Perez-Magarino i Gonzales-san Jose, 2004). Na sličan način Burns sa suradnicima (2003) povezuje visoke koncentracije antocijana s veličinom bobice Cabernet sauvignona. Iz Slike 17 vidimo da nema značajnih razlika između dviju sorti Babice i Crljenka kaštelanskog u uzorcima u kojima se fermentacija odvijala uz dodatak enzima Vinozym Vintage FCE. Dodatak enzima Sihazym Extro dao je različite rezultate za sortu Babicu i sortu Crljenak kaštelanski (Slika 18). Vrijednost svjetline (L) je više izraženija kod uzorka sorte Babica, dok su ostale vrijednosti a*, b*, C i H veće kod uzoraka sorte Crljenak kaštelanski.

Iz Priloga 1 i 2 možemo vidjeti utjecaj dodatka SO₂ na uzorke sorte Babica i Crljenak kaštelanski. Vidljivo je da je kod obje sorte dodatak SO₂ utjecao na pad parametara a* (crvenila) i b* (žutilo), te intenziteta boje (C), a povećanje svjetline (L) i nijanse boje (H). Razlog tome može biti svojstvo sumporovog dioksida koji ima sposobnost smanjenja kinonskih struktura, i/ili stvaranja spojeva bez boje (Boulton i dr., 2001).

Usporedba s literaturom. Postoji veliki broj znanstvenih istraživanja o primjeni pektolitičkih enzima u proizvodnji vina. Rezultati istraživanja kreću se od vrlo pozitivnih do potpunog izostanka enzimske aktivnosti, što se objašnjava razlikama u strukturi različitih sorti grožđa i/ili u razlici između komercionalnih enzimskih preparata. Također bitna je čistoća enzimskog preparata, jer ako je prisutna β-glukozidaza, antocijanini se mogu prevesti u manje stabilne aglikonske oblike, što rezultira gubitkom boje (Sacchi i dr., 2005). Dobre rezultate primjene pektolitičkih enzima na ekstrakciju antocijana dobili su Bichescu i sur. (2012). Uz kontrolni tretman bez enzima, ispitivan je pektolitički enzim Endozym Ruby, u dvije različite doze (1,5g/100kg grožđa i 3,0g/100 kg grožđa). Enzimskom maceracijom povećana je ekstrakcija antocijana, a najveći sadržaj antocijana zabilježen je u uzorku sa većom dozom enzima Endozym Ruby (3,0g/100 kg grožđa).

Mojsov i sur. (2010) ispitivali su utjecaj dodatka različitih pektolitičkih enzimskih preparata (**Vinozym Vintage FCE**, Trendin Rot DF i Rohapect VR-C) na sorti grožđa Vranec. Primjena enzimskih preparata dovela je do povećanja organoleptičkih karakteristika (boje). Preparati **Vinozym Vintage FCE** i Trenolin Rot DF su pokazali intenzivniju ekstrakciju crvenih pigmenata grožđa i povećanje intenziteta boje. Vrijeme filtracije je bilo tri puta kraće korištenjem ova dva enzima, u odnosu na kontrolni uzorak. Ova istraživanja su u skledu s

rezultatima dobivenim u ovom radu; primjena enzimskog preparata Vinozym Vintage FCE rezultirala je s povećanjem intenziteta boje, posebice kod sorte Crljenak kaštelanski.

6. ZAKLJUČAK

Maceracija masulja pektolitičkim enzimima Vinozym Vintage FCE i Sihazym Extro, kod dvije sorte sa područja Kaštela (Babica i Crljenak kaštelanski), pokazala je različite rezultate, ovisno o primijenjenoj sorti grožđa.

Primjena pektolitičkih enzima u maceraciji masulja sorte Babica nije bitno utjecala na promjenu intenziteta boje (L), svjetline (L), te crvenila (a^*), dok je djelomično utjecala na smanjenje tona boje (H), te žutila (b^*), u odnosu na uzorke kod kojih je provedena fermentacija bez dodatka enzima.

Oba enzimska preparata primijenjena u maceraciji masulja sorte Crljenak Kaštelanski značajno su utjecala na povećanje intenziteta boje (C), svjetline (L) te parametara a^* (crvenilo) i b^* (žutilo), u odnosu na kontrolni tretman bez enzima.

Određivanje kolorimetrijskih karakteristika pokazalo je da dva različita enzimska preparata (Vinozym Vintage FCE i Sihazym Extro) daju različite vrijednosti parametara L, a^* , b^* , C i H kod istih sorti grožđa.

Općenito se može zaključiti da je primjena enzimskih preparata pozitivno utjecala na kolorimetrijske značajke boje kod obiju sorti grožđa.

7. LITERATURA

- Anonymous 1, Enzymes in Whinemaking <http://goo.gl/OmgQAQ>, pristupljeno lipanj, 2016.
- Álvarez, I., Aleixandre, J.L., García, M.J., Lizama V. (2006) Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. *Anal. Chim. Acta*, **563**, 109-115.
- Bichescu, C., Bahrim, G., Stanciuc, N., Rapeanu, G. (2012) Color enhancement of Feteasca neagra wines by using pectolytic enzymes during maceration, *AUDJG – Food Technology*, **36**, 18-25.
- Boulton R. (2001) The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *Am. J. Enol. Vitic.* **52**, 67-87.
- Burns J., Landrault N., Mullen W., Lean M.E.J., Crozier A., Teissedre P.-L. (2003) Variations in the profile and content of anthocyanins in wines made from Cabernet sauvignon and hybrid grapes. *Bulletin de l'OIV*, **76**, 263-280.
- Capounova D., Drdak M. (2002) Comparision of some commercial pectic enzyme preparations applicable in wine technology., *Czech. J. Food Sci.* **20**, 131- 134.
- Cheyrier, V., Duenas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J.-M., Sarni-Manchado, P., Fulcrand, H. (2006) Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**, 298-305.
- Cliff, M.A., King, M.C., Schlosser, J. (2006) Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. *Food Res. Int.* **40**, 92-100.
- Gil-Muñoz, R., Gómez-Plaza E., Martínez A., López-Roca, J.M. (1997) Evolution of the CIELAB and other spectrophotometric parameters during wine fermentation. Influence of some pre and postfermentative factors. *Food Res. Int.* **30**, 699-705.
- Heim, K.E, Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 572–584.
- Hunter, R.s., Harold, R.W., (1987) The Measurement of Appearance, 2. izd., Wiley, New York.

Hornsey, I. (2007) The chemistry and biology of winemaking. The royal society of chemistry, Cambridge, UK.

Kazazić, P.S. (2004) Review: Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **55**, 279-290.

Kelebek, H., Canbas, A., Selli, S., Saucier, C., Jourdes, M., Glories, Y. (2006) Influence of different maceration times on the anthocyanin composition of wines made from *Vitis vinifera* L. cvs. Bogčazkere and kuzgozu, *J. Food Eng.* **77**, 1012–1017.

Konica Minolta (2011) Precise color communication, <http://www.konicaminolta.com> . pristupljeno 30. lipnja 2016.

La Notte, E., Liuzzi, V. A., Gambacorta, G. (1993) Il colore del vino in relazione alla frazione antocianica ionizzata. Influenza del sistema di macerazione. *Riv. Viticol. Enol.* **1**, 21–35.

Jackson, R. S. (2008) Wine science – principles, practice, perception. 2. izd., Academic Press, San Diego, USA.

Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Billot, J., (1990) Fruit Phenolics. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Mojsov, K.D., Andronikov, D., Janevski, A., Jordeva, S., Zezova, S., (2015) Enzymes and wine-the enhanced quality and yield. *Advanced technologies*, **4**, 94-100.

Monagas, M., Gomez-Cordoves, C., Bartolome, B. (2006) Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. *Food Chem.* **95**, 405-412.

Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (2009) Wine chemistry and biochemistry, Springer, New York, US.

Perez-Magarino S., Gonzales-San Jose M.L. (2004) Evolution of flavanols, anthocyanins, and their derivatives during the aging of red wines elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. *J. Agric Food Chem.* **52**, 1181–1189.

Radovanović, V. (1986) Tehnologija vina. Građevinska knjiga, Beograd.

Riberreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A. (2006) Handbook of enology Vol. 1, The microbiology of wine and vinifications 2. izd., John Wiley & Sons, Chichester, England.

Riberreau-Gayon, P., Glopires, J., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006a) Handbook of enology Vol. 2, The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments, 2. izd., John Wiley & Sons, Chichester, England.

Rio Segarde, s., Fabrizio, T., Gerbi, V., Rolle, L. (2015) Impact of maceration enzymes on skin softening and relationship with anthocyanin extraction in wine grapes with different anthocyanin profiles, *Food Res. Int.*, **71**, 50-57.

Robinson, J. (2006) The Oxford Companion to Wine, Oxford University Press, **3**, str. 144.

Romero-Cascales, i., Ros-García, J.M., López-Roca, J.M., Gómez-Plaza E. (2012) The effect of a commercial pectolytic enzyme on grape skin cell wall degradation and colour evolution during the maceration process. *Food Chem.*, **130**, 626-631.

Sacchi K.L., Bisson L.F., Adams D.O. (2005) A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *J. Agric Food Chem.* **56**, 197-206.

Tosun, I., Ustun, N.S., Tekguler, B. (2008) Physical and Chemical Changes During Ripening of Blackberry Fruits. *Sci. Agric.* **65**, 87-90.

Yang, D.Y., Kakuda, Y., Subden, R.E. (2006) Higher alcohols, diacetyl, acetoin and 2,3-butanediol biosynthesis in grapes undergoing carbonic maceration. *Food Res. Int.*, **39**, 112-116.

8. PRILOZI

Prilog 1. Dobivene vrijednosti kolorimetrijskih karakteristika ispitivanih uzoraka: svjetline (L), crvenila(a*), žutilo (b*), intenziteta boje (C) i nijanse boje (H) kod sorte Babica

Oznaka uzorka	L*	a*	b*	C*	H
B0 prije SO2	82,51	12,13	19,66	23,1	58,33
B0 nakon SO2	92,35	3,55	8,83	9,52	68,07
BA1	74,07	28,56	9,47	30,09	18,35
BA2	56,67	45,69	17,01	48,75	20,42
BA3	43,15	57,79	25,08	63	23,46
BA4	37,43	58,69	25,08	63,82	23,14
BA5	24,82	53,71	32,58	62,82	31,24
BA6	31,32	51,41	21,56	55,74	22,75
BA7	32,89	50,63	26,3	57,05	27,45
BB1	85,52	15,98	5,66	16,95	19,52
BB2	64,15	40,35	10,44	41,68	14,5
BB3	35,58	59,29	24,44	64,13	22,4
BB4	30,69	59,59	27,43	65,6	24,72
BB5	29,6	58,21	27,17	64,24	25,02
BB6	31,63	52,34	21,56	56,6	22,39
BB7	30,54	50,71	25,87	56,93	27,02
BC1	77,55	24,59	8,88	26,15	19,84
BC2	50,37	55,27	17,38	57,94	17,45
BC3	40,94	60,27	18,87	63,15	17,38
BC4	29,4	58,07	28,79	64,81	26,38
BC5	35,5	60,2	21,32	63,86	19,5
BC6	37,6	51,7	15,48	53,97	16,67
BC7	37,6	49,04	21,47	53,53	23,65

Prilog 2. Dobivene vrijednosti kolorimetrijskih karakteristika ispitivanih uzoraka: svjetline (L), crvenila(a*), žutilo (b*), intenziteta boje (C) i nijanse boje (H) kod sorte Crljenak kaštelanski

Oznaka uzorka	L*	a*	b*	C*	H
Z0 prije so2	66,62	35,23	18,29	39,7	27,44
Z0 nakon so2	94,72	2,38	7,96	8,31	73,34
ZA1	30,55	60,36	30,48	67,62	26,79
ZA2	24,87	57,78	39,72	70,12	34,51
ZA3	29,44	61,5	39,25	72,96	32,54
ZA4	28,05	60,38	40,16	72,51	33,63
ZA5	28,17	60,58	40,18	72,69	33,55
ZA6	24,64	57,7	37,49	68,81	33,01
ZA7	12,64	42,94	20,88	47,75	25,93
ZB1	29,33	59,05	35,45	68,87	30,98
ZB2	31,53	62,48	38,51	73,4	31,65
ZB3	31,42	62,3	36,75	72,33	30,53
ZB4	33,85	62,78	31,85	70,39	26,9
ZB5	37,02	63,02	26,79	68,48	23,03
ZB6	26,97	57,5	30,87	65,26	28,23
ZB7	23,45	53,98	25,43	59,27	25,37
ZC1	26,97	59,08	35,56	68,96	31,04
ZC2	26,88	60,08	41,32	72,92	34,52
ZC3	25,55	58,74	40,99	71,62	34,91
ZC4	29,77	62,4	41,22	74,78	33,45
ZC5	29,23	62,08	41,98	74,95	34,07
ZC6	24,59	57,87	39,08	69,83	34,03
ZC7	21,12	54,33	33,74	63,96	31,84