

Primjena enzima u proizvodnji vina muškatih sorata

Matić, Erik

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:546923>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**PRIMJENA ENZIMA U PROIZVODNJI VINA MUŠKATNIH
SORATA**

DIPLOMSKI RAD

Erik Matić

Zagreb, srpanj, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Hortikultura – Vinogradarstvo i vinarstvo

**PRIMJENA ENZIMA U PROIZVODNJI VINA MUŠKATNIH
SORATA**

DIPLOMSKI RAD

Erik Matic

Mentor:

Prof.dr.sc. Ana Jeromel

Zagreb, srpanj, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Erik Matić**, JMBAG 0178113281, rođen 24.06.1998. u Puli, izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

PRIMJENA ENZIMA U PROIZVODNJI VINA MUŠKATNIH SORATA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Erika Matića**, JMBAG 0178113281, naslova

PRIMJENA ENZIMA U PROIZVODNJI VINA MUŠKATNIH SORATA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Prof.dr.sc. Ana Jeromel mentor _____
2. Izv.prof.dr.sc. Ana-Marija Jagatić Korenika član _____
3. Prof.dr.sc. Marko Karoglan član _____

Zahvala

Ovime zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ani Jeromel na pomoći, potpori te savjetima koji su mi pomogli tijekom pisanja diplomskog rada.

Također zahvaljujem se svim svojim prijateljima, kolegama te poznanicima koji su mi studentske dane učinili nezaboravnima. Hvala vam na svojoj pomoći koja mi je bila potrebna u teškim trenucima, ali i na svim zajedničkim trenucima kada je sve bilo u redu.

Posebnu zahvalnost upućujem svojoj cijeloj obitelji na podršci i savjetima kojima su mi olakšali ovaj dugi put. Dragi nono ovaj rad posvećujem tebi.

I na kraju, najveću zaslugu za sve što sam postigao u životu pripisujem svojim roditeljima i sestri. Bez vas sve ovo ne bi bilo moguće. Hvala vam što se uvijek bili tu uz mene. Hvala vam na strpljenju, vjeri, razumijevanju i ljubavi.

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. PREGLED LITERATURE | 2 |
| 2.1. Primjena enzima u vinarstvu | 2 |
| 2.2. β -glukozidaze | 3 |
| 2.3. Izvori glikozidaza | 6 |
| 2.4. Priprema enzima | 7 |
| 2.5. Sortne karakteristike | 9 |
| 2.5.1. Muškati žuti | 9 |
| 2.5.2. Muškati ruža | 10 |
| 2.6. Utjecaj β -glukozidaza na vino | 12 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 15 |
| 3.1. Osnovna analiza vina | 16 |
| 3.1.1. Određivanje alkoholne jakosti | 16 |
| 3.1.2. Određivanje ukupnog suhog ekstrakta | 16 |
| 3.1.3. Određivanje hlapljive kiselosti | 16 |
| 3.1.4. Određivanje ukupne kiselosti | 16 |
| 3.1.5. Određivanje pH vrijednosti | 17 |
| 3.1.6. Određivanje slobodnog, vezanog i ukupnog sumporovog dioksida | 17 |
| 3.1.7. Određivanje pepela u vinu | 17 |
| 3.2. Dodavanje enzima u vino | 17 |
| 3.3. Određivanje hlapljivih aromatskih spojeva | 18 |
| 3.4. Senzorno ocjenjivanje | 19 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 20 |
| 4.1. Rezultati osnovnih analiza | 20 |
| 4.2. Rezultati analize hlapljivih aromatskih spojeva | 21 |
| 4.2.1. Terpeni | 21 |
| 4.2.2. C13-norizoprenoidi | 23 |
| 4.2.3. Aldehidi | 24 |
| 4.2.4. Hlapljivi fenoli | 25 |
| 4.2.5. Masne kiseline | 26 |
| 4.2.6. Esteri | 28 |

| | |
|--|----|
| 4.2.7. Alkoholi..... | 31 |
| 4.3. Rezultati senzornog ocjenjivanja..... | 33 |
| 4.4. Rasprava | 34 |
| 5. ZAKLJUČAK..... | 36 |
| 6. POPIS LITERATURE | 37 |
| 7. PRILOZI..... | 43 |
| Životopis..... | |

Sažetak

Diplomskog rada studenta **Erika Matića**, naslova

PRIMJENA ENZIMA U PROIZVODNJI VINA MUŠKATNIH SORATA

Veliki dio aromatskih spojeva nalazi se u vinu u vezanom obliku najčešće vezano na šećernu jedinicu. Kako bi se vinu povećao aromatski intenzitet potrebno je te vezane aromatske spojeve osloboditi. To se kidanje veze obavlja uz pomoć enzima, točnije enzima iz skupine glikozidaza – β -glukozidazama. Takvo se oslobađanje najčešće vrši na aromatičnim sortama kako bi se njihov intenzitet još više izrazio i postao primamljiviji krajnjim potrošačima. U ovom radu istraživana su dva enzima, Lallzyme Beta i Endozym β -Split na vinima 'Muškata žutog' i 'Muškat ruže'. Nakon tretmana provedene kemijske analize pokazale su pozitivan utjecaj korištenih enzima na povećanje koncentracije aromatskih spojeva. Posebno se pozitivan utjecaj pokazao kod spojeva poput terpena i estera koji su značajno povećali voćni i cvjetni intenzitet vina. Na kraju, senzorna ocjena ukazala je na različitost tretiranih vina te se može zaključiti kako je korištenje ovih enzima opravdano sa ciljem proizvodnje vina veće kakvoće.

Ključne riječi: β -glukozidaze, muškat, aroma, terpeni, esteri

Summary

Of the master's thesis – student **Erik Matić**, entitled

APPLICATION OF ENZYMES IN THE PRODUCTION OF MUSCAT WINE

A large part of aromatic compounds is found in wine in a bound form, usually bound to a sugar unit. In order to increase the aromatic intensity of the wine, it is necessary to release these bound aromatic compounds. This breaking of the bond is done with the help of enzymes, more precisely enzymes from the group of glycosidases - β -glucosidases. Such release is most often carried out on aromatic varieties in order to express their intensity even more and become more attractive to end consumers. In this work, two enzymes, Lallzyme Beta and Endozym β -Split, were investigated on 'Muscat yellow' and 'Muscat rose' wines. After the treatment, the chemical analyzes performed showed a positive influence of the enzymes used on the increase in the concentration of aromatic compounds. A particularly positive impact was shown in compounds such as terpenes and esters, which significantly increased the fruity and floral intensity of the wine. In the end, the sensory evaluation indicated the diversity of the treated wines, and it can be concluded that the use of these enzymes is justified with the aim of producing higher quality wines.

Keywords: β -glucosidases, muscat, aroma, terpenes, esters

1. UVOD

Potražnja vrhunskih vina primamljivih organoleptičkih svojstava zadnjih se nekoliko godina sve više povećava. Ta je potražnja vinogradare i vinare natjerala na korištenje novih metoda i tehnika pri proizvodnji. Među tim inovacijama znatno se unaprijedilo i povećalo korištenje nekih prirodnih i kemijskih preparata u svrhu olakšanja proizvodnje te povećanja kvalitete krajnjeg proizvoda. Neki od tih preparata jesu enzimi. Njihovo je korištenje direktno povezano sa povećanjem kvalitete vina kako bi se zadovoljile potrebe tržišta. Kvaliteta vina se određuje već u vinogradu pravilnom njegovom i proizvodnjom visoko kvalitetnog grožđa, međutim na kvalitetu se utječe i tijekom proizvodnje. Nakon fermentacije povećanje kvalitete se prvenstveno odnosi na dozrijevanje te na oslobađanje aroma koji će vinu dati novi profil. Oslobađanje aroma može se potencirati primjenom enzima, točnije glikozidaza. Njihova je primjena u vinarstvu sve veća, a podrazumijeva oslobađanje aromatskih prekursora. Rad im se temelji na razbijanju glikozidne veze između šećernih jedinica i aglikona koji jednom oslobođeni stvaraju tipične sortne arome. U slučaju aromatskih sorti poput Muškata, te se arome najviše vežu uz terpene i C13-norizoprenoide.

Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj komercijalno dostupnih enzima sa β -glukozidaznom aktivnošću na oslobađanje vezanih aromatskih spojeva, a zatim proučiti i definirati razlike u mirisu i okusu vina 'Muškata žutog' te 'Muškat ruže' nakon njihova dodavanja. Uz to kemijskim i senzornim analizama ustanoviti jesu li nastale razlike pozitivno utjecale na kvalitetu vina te opravdale primjenu enzima iz ove skupine.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Primjena enzima u vinarstvu

Kvaliteta vina kao i njegov kemijski te aromatski sastav najvećim dijelom ovise o sorti vinove loze. Mnoge senzorne karakteristike kojim se određuje kvaliteta ovise o kompoziciji grožđa što je sortno svojstvo. Međutim na neke se karakteristike može utjecati tijekom proizvodnje poticanjem različitih biokemijskih reakcija. Veliki broj tih reakcija kataliziran je uz pomoć enzima (Moreno-Arribas i Polo, 2009.). Enzimi su zapravo proteini koji djeluju kao biološki katalizatori. Broj industrijski proizvedenih enzima, otprilike njih 30, predstavlja samo mali dio od ukupno otkrivenih enzima. Procjenjuje se da postoji više od 2500 različitih enzima kataliziranih reakcija, a smatra se i da je najmanje 10 različitih enzima uključeno u alkoholnoj fermentaciji (Van Rensburg i Pretorius, 2000.). Enzimi imaju ključnu ulogu u modernoj vinarskoj proizvodnji. Njihovo porijeklo može biti različito, ali najčešće potječu od grožđa i mikroorganizama. Kvasci kao autohtona mikroflora na grožđu te mikroorganizmi prisutni u vinu i podrumu tijekom proizvodnje predstavljaju moguće izvore. Neki enzimi imaju pozitivan, dok neki imaju štetni utjecaj na kvalitetu vina. Kod primjene u vinarstvu, enzimi moraju ispuniti određene zahtjeve. Zbog prisutnosti organskih kiselina i niskog pH koji je prisutan u voćnim vrstama enzimi moraju biti rezistentni na kiselost te biti aktivni u takvim uvjetima. Zatim, enzimi moraju biti rezistentni i na SO₂ koji se dodaje tijekom fermentacije kako bi se izbjegla kontaminacija nekim drugim mikroorganizama osim kvasaca. Zbog toga, ali ne manje važno, enzimi moraju biti otporni i na niske temperature proizvodnje koje se postižu radi postizanja veće kvalitete vina (Yang i sur. 2021.). Njihova je uloga konstantna tijekom proizvodnje, oni kataliziraju reakcije već od same prerade i fermentacije sve do dozrijevanja vina (Mojsov, 2013.). U modernom vinarstvu imaju važnu ulogu u provedbi nekih tehnoloških postupka tijekom proizvodnje poput taloženja, ekstrakcije boje i postizanja stabilnosti. Važni su kod proizvodnje vina veće kvalitete tako da sudjeluju u oksidaciji fenola grožđa, formiranju hlapljivih spojeva prije fermentacije kao i u transformaciji bezmirisnih spojeva u aktivne tijekom alkoholne i malolaktične fermentacije (Moreno-Arribas i Polo, 2009.). Danas se u proizvodnji vina koristi veliki broj različitih enzima. Trenutno dostupni komercijalni enzimski preparati najčešće su kokteli različitih aktivnosti (Claus i Mojsov, 2018.). Najveću aplikaciju među njima imaju pektinaze, β-glukanaze, β-glukozidaze, glukoza oksidaze, lizozimi, proteaze, tanaze i ureaze. Utječu na povećanje prinosa soka, pospješuju oslobađanje aroma i boje u vinu, ubrzavaju filtraciju i bistrenje, skraćuju vrijeme fermentacije i općenito osiguravaju proizvodnju pića (Yang i sur. 2021.). Najbrojniju skupinu čine enzimi koji pospješuju taloženje i obradu vina (pektinaze, glukanaze, ksilanaze i proteaze). Na smanjenje stvaranja etil karbamata utječu ureaze, dok se za smanjenje razine alkohola u vinu koriste glukoza oksidaze. Za oslobađanje sortnih aroma od njihovih prekursora koriste se glikozidaze (Mojsov, 2013.). Sve spomenute uloge enzima osiguravaju veću kvalitetu vina te smanjuju troškove proizvodnje (Yang i sur. 2021.).

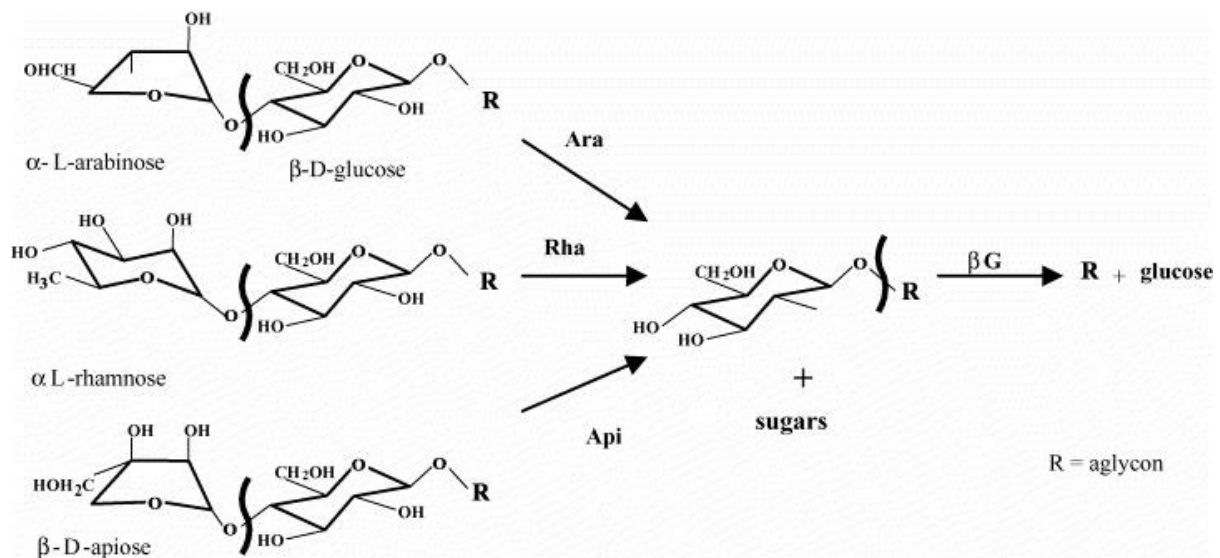
Endogeni enzimi grožđa, kvasaca i mikroorganizama često nisu dovoljno učinkoviti pa ne mogu katalizirati reakcije do kraja (Mojsov, 2013.). Problem njihove aktivnosti javlja se pojavom tipičnih proizvodnih uvjeta, visokih koncentracija šećera, alkohola i polifenola te niskog pH. Takvi uvjeti, često u sinergističkim odnosima inhibiraju aktivnost enzima koji za posljedicu ostavljaju značajnu količinu ne transformiranih spojeva slobodnih za sljedeće reakcije. Kako bi se veći dio tih spojeva transformiralo i time utjecalo na povećanje kvalitete vina dodaju se egzogeni enzimi. Danas postoji veliki broj komercijalnih preparata koji su dostupni i vrlo važni kod moderne proizvodnje vina. Posebno važnu ulogu imaju prilikom taloženja i oslobađanja aromatskih spojeva od bezmirisnih prekursora (Moreno-Arribas i Polo, 2009.). Komercijalni enzimi dobivaju se iz biljnih i životinjskih tkiva te mikroorganizama. Zbog velikih troškova prilikom proizvodnje enzima iz biljnih i životinjskih tkiva, istraživači su se okrenuli mikroorganizmima na način da izoliraju sojeve koje proizvode enzimi iz prirode, a zatim optimizirajući uvjete dobivaju veće količine enzima sa određenom funkcijom (Yang i sur. 2021.). Prema OIV-u zakonom je određeno da se samo *Aspergillus niger* i *Trichoderma spp.* mogu koristiti za proizvodnju enzima. Kod proizvodnje enzima koji se koriste u vinarstvu, iz selekcioniranih sojeva uzgojenih u fermentorima pri aerobnim uvjetima iz *Aspergillus niger* se dobivaju pektinaze, hemicelulaze i glikozidaze, a iz *Trichoderma spp.* glukanaze. (Mojsov, 2013.). Danas se tehnike genetskog inženjeringa za genetsko modificiranje sojeva koje proizvode enzimi najviše koristi u sklopu komercijalne proizvodnje enzima. Takvim se postupcima osim veće proizvodnje enzima, utječe i na smanjenje nepoželjnih sporednih aktivnosti koje enzimi mogu odraditi (Yang i sur. 2021.). Različiti tehnološki postupci tijekom proizvodnje vina od velike su važnosti za dobru primjenu enzima, pa se navodi da provođenjem maceracije crna vina sadrže više tvari boje, tanina, aroma kao i njihovih prekursora koji će onda biti cilj enzimima. Vizualni aspekt vina od velike je važnosti obzirom da je to nešto što će potrošač prvo primijetiti te će imati veliki utjecaj na njegovo daljnje prihvaćanje. Osim pozitivnog učinka na vino, enzimi također utječu na smanjenje troškova proizvodnje. Omogućuju maksimalno iskorištenje i učinkovitost različitih oprema i tehnika, što rezultira smanjenjem potrošnje energije pa se enzimi smatraju i ekološkim preparatima. Međutim, aplikacija enzima u vinarstvu je još u počecima te postoji veliki prostor za napredak i nova otkrića (Mojsov, 2013.).

2.2. β -glukozidaze

Hlapljivi aromatski spojevi predstavljaju važan faktor u kvaliteti vina. Više od 800 molekula pronađenih u koncentracijama od mg/L do ng/L podijeljeno je u nekoliko skupina. Te skupine čine monoterpeni (linalol, geraniol, nerol, β -citronelol i α -terpineol), C13-norizoprenoidi (3-oxo- α -ionol, vomifoliol, β damaskenon, 3-hidroksidamaskenon), benzenski derivati i fenoli (4-vinilguajakol, guajakol i 4-vinilfenol). Sintetiziraju se i razvijaju u bobicama tijekom njihova dozrijevanja, a važni su kod određivanja sortne arome (de Ovalle, Brena, i González-Pombo, 2021.). Monoterpeni i C13-norizoprenoidi iz grožđa najvažniji su aromatski spojevi u vinarstvu,

posebice monoterpeni kod bijelih vina. Nažalost, veliki dio tih spojeva vezano je s šećernom jedinicom pa kao ne hlapljivi spojevi čine rezervu aromatskih prekursora koji se mogu osloboditi i utjecati na aromu vina (González-Pombo i sur. 2014.). Terpeni prisutni u grožđu nalaze se u slobodnom hlapljivom ili u glikozidiranom ne hlapljivom obliku. Njihova je uloga u stvaranju arome vina iz tog razloga jako velika (Zhang i sur. 2019.). Osim navedenih spojeva, neki alifatski alkoholi i benzenski derivati također predstavljaju hlapljive spojeve identificirane u grožđu u formi glikozidnih prekursora. Oslobođanjem tako vezanih prekursora u vinu rastu koncentracije nekih spojeva poput linalola, geraniola, β -damaskenona, TDN-a i vinil guajakola, koji igraju važnu ulogu u stvaranju arome različitih sorti (Moreno-Arribas i Polo, 2009.). Čak i malo povećanje koncentracije tih spojeva tijekom fermentacije može, zbog njihovog niskog praga detekcije, značajno utjecati na aromu vina (Lee i Park, 2020.). Odnos između vezanih i slobodnih oblika razlikuje se u moštu i vinu u većim omjerima (Zhang i sur. 2019.). Shoseyov i sur. (1988.) navode kako omjer između vezanih i slobodnih monoterpena varira između 5:1 kod sorte 'Muškat Aleksandrijski' i 1:1 u nekim ne muškatnim sortama. Kidanje tako vezanih glikozidnih spojeva provodi se kiselom ili enzimatskom hidrolizom. Kisela se hidroliza odvija sporo tijekom čuvanja vina, ali ju se može ubrzati indukcijom topline (Palomo i sur. 2005.). Može utjecati na sastav vezanih aglikona te tako stvarati nepoželjne arome. S druge strane enzimatska hidroliza, pogotovo ona provođena β -glukozidazama vrlo je aktivna u hidrolizi prekursora u moštu i vinu čime se znatno utječe na aromu vina (Zhang i sur. 2019.). Upravo je taj utjecaj na aromu i okus vina poticanjem proizvodnje aromatskih spojeva najvažnija uloga β -glukozidaza (Zhang i sur. 2021.a). Međutim, aktivnost tih enzima može biti osjetljiva na proizvodne uvjete poput visoke koncentracije šećera i alkohola te niskog pH (Zhang i sur. 2019.). Bitna razlika između ovih hidroliza jest da se enzimatskom hidrolizom ne utječe na modifikaciju aglikona (González-Pombo i sur. 2014.). Prekursori aroma mogu se sporo hidrolizirati i tijekom dozrijevanja vina kada se može dogoditi da se neki pozitivni spojevi, poput linalola, nerola i geraniola, pretvore u nepoželjne spojeve koji umanjuju vrijednost dozrijevanja (Spagna i sur. 2000.). Van Rensburg i Pretorius (2000.) navode kako se upravo ti spojevi nakon oslobođanja, zbog niskog pH hidroliziraju, transformiraju ili oksidiraju u spojeve poput α -terpineola. Otkrićem glikozidiranih prekursora hlapljivih spojeva, porastao je i broj istraživanja usmjerenih razumijevanju faktora koji utječu na hidrolizu prekursora tijekom proizvodnje. Glikozidaze hlapljivih spojeva su najčešće *O*- β -D-glikozidi ili *O*-diglikozidi u kojim je aglikonski dio uvijek vezan za β -D-glukopiranoznu jedinicu. U strukturi diglikozida glukozni dio je dalje zamijenjen sa drugom monosaharidnom jedinicom (L-arabinozom, L-ramnozom ili D-apiozom) (Moreno-Arribas i Polo, 2009.). Slijed enzimске hidrolize poznat je i sastoji se od dva dijela. U prvom se dijelu glikozidna veza cijepa uz pomoć α -arabinofuranozidaze (Ara), α -ramnozidaze (Rha) ili β -apiofuranozidaze (Apio), dok u drugom dijelu β -glukozidaza (BG) oslobađa monoterpenole (González-Pombo i sur. 2014.). Kako navode Mateo i Di Stefano (1997.) u drugom se koraku terpenski spojevi mogu osloboditi samo ako su vezani za jednu šećernu jedinicu. Suprotno tome Maicas i Mateo (2016.) navode kako postoje glukozidaze sa sposobnošću hidrolize glikozidne veze u drugom koraku bez obzira na broj šećera vezanih na

aglikon. Dalje Hüfner i Haßelbeck (2017.) također spominju postojanje biljnih i gljivičnih enzima sa mogućnosti jednokratne hidrolize diglikozida.



Slika 2.1. Enzimatska hidroliza (Izvor: Palmeri i Spagna, 2007.)

Tijekom fermentacije se β -glukozidaze koriste zbog hidrolize glikozidnih prekursora arome (Yang i sur. 2021.). Kidanjem glikozidnih veza poput 1,4- β i 1,6- α veza, formiraju se slobodni terpeni, fenilpropani i specifični alifatski esteri tijekom fermentacije (Zhang i sur. 2021.a). Među njima se posebno ističe hidroliza veze između monoterpenil- β -D-glukozida i šećerne molekule kako bi se povećale aromatske karakteristike i različitost vina (Yang i sur. 2021.). Skupina monoterpena zbog visoke koncentracije prekursora kasnije ima i najveću ulogu u definiranju arome vina (Zhang i sur. 2021.a). Međutim, rad β -glukozidaza može imati i loš utjecaj na vino (Yang i sur. 2021.). Hidrolizom drugih spojeva enzimi mogu utjecati i na sastav fenola. Na primjer, neki sojevi kvasaca proizvode enzime različite aktivnosti koji mogu utjecati na koncentraciju *trans*-resveratrola i antocijanina (Zhang i sur. 2021.a). Hidrolizom antocijanina nastaju antocijanidini koji se u slobodnom obliku brzo degradiraju u bezbojne spojeve te tako smanjuju ili utječu na potpuni gubitak boje crnog vina. Iz tog se razloga glikozidaze za oslobađanje arome u vinu prvenstveno koriste u proizvodnji bijelih vina (Yang i sur. 2021.). Suprotno tome, Todaro i sur. (2008.) spominju povećanje koncentracije *trans*-resveratrola korištenjem β -glukozidaza iz *Aspergillus niger*.

2.3. Izvori glikozidaza

Postoji mnogo izvora β -glukozidaza uključujući arheje, bakterije, eukariote, viruse i neke neidentificirane vrste. Kako navode Huang i sur. (2021.), postoji 8 različitih obitelji glikozid hidrolaze: GH1, GH2, GH3, GH5, GH9, GH30, GH116 i NC (neklasificirano), među kojima GH3 i GH1 obitelji imaju najviše članova. β -glukozidaze različitih obitelji međusobno pokazuju velike razlike, ponajprije u aktivnosti i specifičnosti, a zatim u inhibitorima ili aktivatorima enzima. β -glukozidaze se prirodno nalaze na biljnom materijalu poput grožđa, ali mogu nastati i putem aktivnosti nekih mikroorganizama. Kako su autohtoni endogeni enzimi osjetljivi na proizvodne uvjete (koncentracije šećera i alkohola, razine pH, temperature fermentacije i razine SO_2), danas moderno vinarstvo podrazumijeva i korištenje egzogenih enzimskih preparata. To se najčešće radi dodavanjem komercijalnih preparata dobivenih iz gljive *Aspergillus niger* ili izoliranjem specifičnih sojeva *Saccharomyces* ili ne-*Saccharomyces* kvasaca sa β -glukozidaznom aktivnošću. Ta je aktivnost različita obzirom na soj kvasca, a sintetiziraju se na različitim mjestima u stanici (Zhang i sur. 2021.a). Pripravci pektolitičkih enzima filamentoznih gljiva prikladni su za upotrebu kao egzogene glikozidaze. Takvi pripravci dobiveni iz sigurnih (GRAS) mikroorganizama, *Aspergillus* spp., počeli su se primjenjivati već 70.-ih godina prošlog stoljeća. Njihova specifična glikozidazna aktivnost ističe se u izuzetnoj stabilnosti prema vinskome pH, suprotno enzimima iz drugih izvora (Palmeri i Spagna, 2007.). Gljive nisu jedine sposobne proizvesti enzime ove skupine, već β -glukozidazna aktivnost postoji i kod *Saccharomyces cerevisie* kvasaca (Hernández i sur. 2003.). Laboratorijski testovi na kvascu *Saccharomyces cerevisie* pokazali su da posebni sojevi koji sadrže specifičnu mutaciju ERG20 rezultiraju hiperprodukcijom geraniola (Barbagallo i sur. 2004.). Osim tih kvasaca, utjecaj na aromu i okus vina imaju i rodovi *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaromyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* i *Torulaspora*. Iako starter kulture *Saccharomyces* kvasaca već postoje i sa sigurnošću postižu bržu i konzistentnu fermentaciju sa predvidljivim i željenim karakteristikama, upotreba ne-*Saccharomyces* kvasaca može imati povoljniji učinak na razvoj aroma (Palmeri i Spagna, 2007.). De Ovalle, Brena i González-Pombo (2021.) također navode potencijal ne-*Saccharomyces* kvasaca kao alternativu za proizvodnju β -glukozidaza. Takvi su enzimi pokazali tolerantnost prema uvjetima proizvodnje na koje su endogeni enzimi osjetljivi. Specifični sojevi među vrstama *Hanseniaspora uvarum*, *Wickerhamomyces anomalus* i *Trichosporon asahii* pokazali su veću β -glukozidnu aktivnost (Zhang i sur. 2021.a). Osim gljiva i kvasaca, neke mliječno-kisele bakterije, poput *Oenococcus oeni*, koje su odgovorne za provođenje malolaktične fermentacije također mogu predstavljati izvor β -glukozidazne aktivnosti. Njihova prednost u odnosu na enzime iz kvasaca jest u većoj aktivnosti i stabilnosti sa manje nepoželjnih aktivnosti sa strane (Barbagallo i sur. 2004.).

Uspoređujući komercijalni enzim *Aspergillus niger* sa enzimima nekih sojeva kvasaca uočavaju su značajne razlike. Obzirom na inhibiciju šećerom, ali i na visokoj aktivnosti pri tipičnom pH, komercijalni bi enzim bio najbolji za kraj fermentacije. S druge strane, enzimi

kvasaca, zbog optimalne temperature od 20°C i niže, aktivnosti pri tipičnom vinskom pH najbolji su za direktno dodavanje tijekom fermentacije (Barbagallo i sur. 2004.). Optimalni pH pri kojem su biljne glukozidaze aktivne kreće se od 4,0-6,0. Pri nižim vrijednostima samo je 5-15% maksimalne aktivnosti utvrđeno kod ove skupine endogenih enzima. *Saccharomyces* β -glukozidaze poprilično su otporne na sadržaj glukoze. U prisutnosti od 200 g/L glukoze aktivnost enzima pada za 40%, dok se pad aktivnosti od 50% očitava pri sadržaju etanola od 5%. Isto tako, pad aktivnosti od 25% primijećen je pri anaerobnim uvjetima. Unatoč tome, pronađeno je kako su glukozidaze *Saccharomyces* kvasaca stabilne najmanje 35 dana pri normalnim uvjetima u moštu i vinu. Biljne i mikrobne β -glukozidaze hidroliziraju primarne i sekundarne alkohole, dok tercijarne alkohole preferiraju enzimi dobiveni iz gljiva. Neki oslobođeni aglikoni poput β -damaskenona, vitispirana i teaspirana mogu uzrokovati oslobađanje drugih jačih aroma nakon još nekoliko enzimatskih ili kemijskih transformacija (Pogorzelski i Wilkowska, 2007.). Dodavanje egzogenih enzima za oslobađanje aroma poprilično je skup postupak koji mnogi vide kao neprirodan i umjetan utjecaj čovjeka na vino (Van Rensburg i Pretorius, 2000.). Neovisno o dodavanju egzogenih glukozidaza, pektinaze dodane prilikom taloženja i maceracije također mogu imati sličnu aktivnost obzirom da sadrže neke glukozidaze u malim količinama.

2.4. Priprema enzima

Komercijalni enzimski preparati gljive *Aspergillus niger* koriste se već duže vrijeme u topljivom obliku. Međutim, provođenje enzimskih reakcija može biti problematično korištenjem takvih preparata. S druge strane, imobiliziranjem enzima postiže se veća iskoristivost, ušteda i bolja kontrola enzimskih reakcija, što je posebice važno kod mladih vina radi brzog otpuštanja primamljivih aroma (González-Pombo i sur. 2014.). Metode imobilizacije enzima istraživane su zbog povećanja organoleptičkih svojstava hrane i pića. Otkriveno je da se kao nosače kod imobilizacije mogu koristiti organske i anorganske tvari. Organske čine Eupergit C, Xad 7, celuloza, amin agaroz i hitosan gelovi, dok anorganske matrice predstavljaju α i γ aluminij te bentonit (Palmeri i Spagna, 2007.). Imobilizacija β -glukozidaza može se postići uz pomoć različitih nosača poput alginat-hitina i hitosan-hitina. U radu Romo-Sánchez i sur. (2014.) kao najprikladniji nosač pokazao se hitosan. Tako imobilizirani enzimi imali su prednosti korištenja manjih doza, veće stabilnosti, mogućnosti ponovnog korištenja i dobrih sposobnosti za oslobađanje aroma u vinu. Martino, Pifferi i Spagna (1996.) također preporučuju hitosan koji je pokazao zadovoljavajući afinitet prema β -glukozidazama i koji je uspoređujući ga sa slobodnim enzimima pokazao pomak tolerantnosti prema kiselom pH. González-Pombo i sur. (2014.) su imobilizaciju glikozidaza *Aspergillus niger* obavili uz pomoć akrilnih perli aktiviranih epoksidom (Eupergit C). U prethodnom radu González-Pombo i sur. (2011.) navode kako je počišćeni ekstrakt ekstracelularne β -glukozidaze iz *Issachenkia terricole* pokazao aktivnost i u prisutnosti glukoze (100 g/L), etanola (18%), pH (3.0) i metabisulfita (60 mg/L). Imobilizacija na Eupergit C poboljšala je njegovu stabilnosti i omogućila povećanje arome bijelog vina

'Muškat'. Komercijalni preparati često mogu provoditi više različitih glikozidnih aktivnosti zbog kojih se mogu javiti nepoželjne promjene (Martino i sur. 2000.). Te se nepoželjne promjene posebice javljaju ako enzimi imaju esteraznu, antocijanaznu i polifenoloksidaznu aktivnost (Palmeri i Spagna, 2007.). Iz tog razloga razvijeno je nekoliko skupih, ali učinkovitih postupaka pročišćavanja glikozidaza (Martino i sur. 2000.). Međutim, zbog navedenih problema i reduciranja tipičnosti i kompleksnosti arome vina njihovim stalnim korištenjem, takvi se komercijalni preparati nastoje sve manje koristiti (de O valle, Brena, i González-Pombo 2021.). Izbjegavanje napornog pročišćavanja i imobilizacije enzima danas se može postići genetski modificiranim sojevima kvasca koji bi na svojim površinama sadržavali enzime. Kao dodatna prednost ove tehnike navodi se i sinergistički odnos između kvasca i enzima. Odnos se temelji na iscrpljivanju glukoze sa strane kvasca, te na taj način stvaranja zone sa nižim koncentracijama šećera u kojim bi enzimi mogli normalno provoditi svoje aktivnosti (Zhang i sur. 2019.). Kako navode Yang i sur. (2021.) kloniranje gena β -glukozidaza i njihova daljnja ekspresija bila je lakša zbog niske razine ekspresije gena u roditeljskom soju. Gen β -glukozidaza direktno je kloniran u drugi sustav, a zatim prekomjerno izražen zbog dobivanja većeg broja β -glukozidaza. *Pichia pastoris* bila je idealan sustav ekspresije gena kod proizvodnje industrijskih enzima ponajviše zbog visokog kapaciteta proizvodnje proteina i njihove ekspresije. Često je korištena za proizvodnju β -glukozidaza, ali i kao domaćin za kloniranje i ekspresiju rekombiniranih proteina drugih gljiva. Kada β -glukozidaze u vinu potiču stvaranje negativnih aroma ili utječu na druge aktivnosti potrebno ih je ukloniti. Jedan način jest taloženje vina bentonitom koji zbog postizanja stabilnosti smanjuje ukupnu količinu proteina. Među njima bentonit odstranjuje i β -glukozidaze što kasnije može imati pozitivan, odnosno negativan utjecaj zbog manjeg oslobađanja aroma u vinu ukoliko se dodaje u krivom trenutku (Jaeckels i sur. 2015.). Testiranje aktivnosti i stabilnosti β -glukozidaza u vinu obavlja se praćenjem njihove aktivnosti na *p*-nitrofenilglikozid, posebice kod crnih vina. Praćenje te aktivnosti kod različitih glukozidaza može pomoći pri odabiru najboljeg enzima za oslobađanje aroma pri specifičnim uvjetima (Cid i Ellenrieder, 2009.).

2.5. Sortne karakteristike

Ribéreau-Gayon, Boidron i Terrier (1975.) pokušali su okarakterizirati arome muškarnog grožđa i vina. Odredili su da se aromu definira nekoliko terpenskih spojeva poput linalola, nerola, geraniola, α -terpineola i 4 linalol oksida. Ukupna količina ovih spojeva u muškarnoj otopini iznosi 1-3 mg/L. Svaki navedeni spoj ima različite organoleptičke karakteristike i niti jedan nema identični profil sa onim cijelog 'Muškata'. Prag detekcije ovih spojeva se međusobno znatno razlikuje. Geraniol i linalol smatraju se najznačajnijim spojevima zbog visoke koncentracije i niskog praga detekcije (100-130 $\mu\text{g/L}$). Pragovi ostalih spojeva su značajno veći u odnosu na geraniol i linalol, kod nerola i terpineola iznose 400-500 $\mu\text{g/L}$, a kod linalol oksida vrijednosti se kreću između 3000-6000 $\mu\text{g/L}$. U kompletnoj otopini, ovi terpenški spojevi međusobno reagiraju i čine karakterističnu aromu 'Muškata' koja je izraženija nego terpeni pojedinačno.

2.5.1. Muškarni žuti

Moscato giallo, Moscat, Moscatel, Moscato Siro, Moscato Cipro ili kako ga najčešće zovu u našim krajevima 'Muškarni žuti', sorta je vinove loze koja pripada velikoj obitelji Muškata. Smatra se da obitelj vuče podrijetlo sa Bliskog Istoka odakle se dalje širila, pogotovo u mediteranske zemlje. Najviše se uzgaja u sjevernoj Italiji i na Siciliji, ali je prisutna i u drugim vinogradarskim zemljama (Mirošević i Turković, 2003.).

Mladica 'Muškarni žuti' je okrugla, izbrazdana i svijetlozelena, a vršci mladica su uspravni, mali i zelenkasto bijeli. Cvijet je dvospolan. Odrasli listovi su srednje veličine, trodijelni ili peterodijelni s duboko urezanim gornjim sinusima oblika slova U ili V, dok su donji sinusi plitki. Peteljka je duga i zelena, a sinus peteljke je oblika kao gornji sinus lista. Plojka je golog, valovitog i tamnozelenog lica te golog i svijetlozelenog naličja. Zupci su različite veličine i nepravilnog rasporeda. Zreli grozd je srednje velik, piramidalan, srednje zbijen sa jednim ili dva krilca, tanke i zelene peteljke. Zrele bobice su srednje veličine, okrugle i u doba tehnološke zrelosti jantarno žute boje. Kožica je čvrsta, oprášena s uočljivom pupčanom točkom. Meso je bezbojno, sočno i s izraženom sortnom muškarnom aromom. Rast je srednje bujan do bujan. Rodnost je dobra i redovita. Oplodnja je redovita, a dozrijeva u drugom razdoblju. Sorta voli vapnena, propusna i topla tla brežuljkastog reljefa, južnih ekspozicija i toplije klime. Dobre rezultate daje na povišenim i visokim sustavima uzgoja s mješovitim rezom. Osjetljivost na eskorijozu je vrlo velika, srednja na pepelnicu i peronosporu, a dobra na sivu plijesan (Mirošević i Turković, 2003.).

Osim kao vinska sorta koristi se i kao zobatica. Prinosi variraju ovisno o sustavu uzgoja od 6 do 14 t/ha. Nakuplja 16-25% sladora i 5,0-9,0 g/L ukupne kiselosti. Zanimljiva je sorta za proizvodnju desertnih aromatičnih vina, ali i vina ostalih kategorija (Mirošević i Turković, 2003.).

Okus grožđa 'Muškata žutog' dodjeljuje se prvenstveno terpenima i terpenoidima u različitim fazama oksidacije. U radu Caliani i sur. (2015.) spominju etil oktanoat, linalol, α -terpineol, 2-feniletanol, heksansku te oktansku kiselinu kao glavne hlapljive spojeve koji čine aromu pjenušavih vina 'Muškata žutog'. Di Stefano (2013.) spominje linalol kao glavni terpeniski spoj koji određuje aromu 'Muškata žutog'. Osim linalola, ostali spojevi poput *trans* piran linalola te slobodnih i vezanih oblika diola 1, u znatno većim koncentracijama nalaze se kod ove sorte u odnosu na 'Muškat bijeli'. Schievano i sur. (2013.) također spominju visoku prisutnost terpeniskih spojeva među kojim se u najvećim koncentracijama nalaze linalol, geraniol, oksilinalol, limonen, α -terpineol, citronelol i miricen.

2.5.2. Muškat ruža

'Muškat ruža' poznat i po sinonimima poput Muškat ruža omiški, Muškat ruža porečki te Muškat crveni, pripada grupi gotovo ugroženih sorti vinove loze. Podrijetlo sorte i dalje nije sa sigurnošću utvrđeno makar se u nekim starim njemačkim ampelografskim radovima spominje kako je sorta u Tirool donesena iz Hrvatske. Iz tih razloga, moguće je i smatra se da je ova sorta hrvatska autohtona koja se dalje širila u ostale zemlje. Oduvijek je poznata kao sorta za vrhunska desertna vina s visokim sadržajem alkohola, ostatkom neprevrela šećera te iznimnom mirisu i aromi koja podsjeća na divlje ruže po čemu je i dobila ime (Maletić i sur. 2015.). Sorta se spominje još u starijim ampelografskim podacima Bulića (1949.) gdje se navodi kako je sorta bila poznata u Dalmaciji po kvalitetnim crnim desertnim vinima i nazivom Muškat ruža omiški.

Sorta s vegetacijom počinje srednje rano, a dozrijeva u II. razdoblju. Vrh mladice joj je blago povijen, otvoren i paučinasto dlakav. List je srednje velik, okrugao ili pentagonalan, peterodijelan. Sinus peteljke blago je otvoren ili zatvoren, a dno je u obliku slova V. Mladi listići su crvenkasti, dok je odraslima lice tamnozeleno i naličje golo. Cvijet je morfološki hermafroditan, a funkcionalno ženski sa potpuno razvijenim tučkom i zavnutim prašnicima. Slabo je do srednje bujna sorta. Zreli grozd je dug, konusnog oblika, često rastresit, dok su bobice eliptičnog oblika svjetlo crvene boje. Meso je čvrsto i muškatnog okusa. Sorta nije naročito osjetljiva na gljivične bolesti. U pravilu postiže vrlo niske prinose zbog problematične oplodnje i potrebe za oprašivačem. Nakuplja visok sadržaj šećera, dok je ukupna kiselost poprilično niska. Sortu opisuje ugodan i naglašen muškatni miris koji podsjeća na divlju ružu. Vina su najčešće svijetlije crvene boje, aromatična, visoko alkoholna, puna i skladna. Često se zbog ostatka neprevrelog šećera ubrajaju u grupu desertnih vina (Maletić i sur. 2015.).

Zbog niske i neredovite rodnosti, sorta je danas, osim u Istri, dovedena na rub izumiranja. Osim Istre i Dalmacije u kojoj je sorta gotovo nestala, uzgaja se još u susjednim zemljama Italiji i Austriji (Maletić i sur. 2015.). U Istri površine pod 'Muškat ružom' polako rastu, 2011. godine iznosile su 13,55 ha uz proizvodnju od 340,83 hl vina, dok je 2014. zabilježeno 13,63 ha sa proizvodnjom od 379,65 hl vina. Uzgojem ove sorte i proizvodnjom vina se u dijelu Hrvatske i

Slovenske Istre bavi ukupno 4 proizvođača od kojih samo 2 proizvode vino sa zaštićenim geografskim podrijetlom (Peršurić i sur. 2015.).

Kako navode Radeka, Lukić i Peršurić (2012.), variranjem temperature i trajanja maceracije moguće je značajno utjecati na slobodne i vezane sortne arome kod 'Muškata ruže'. Određeno je i 12 ključnih spojeva koji sudjeluju u stvaranju arome, a to su linalol, citronelol, geraniol, β -damaskenon, β -ionon, izoamilni alkohol, 2-feniletanol, etil heksanoat, etil oktanoat, izoamil acetat, etil acetat i dietil sukcinat.

2.6. Utjecaj β -glukozidaza na vino

β -glukozidazni enzimi vrlo su važni u vinarstvu zbog mogućnosti hidrolize vezanih spojeva i oslobađanja aglikona čime utječu na kvalitetu vina. Takvi spojevi jesu monoterpeni i C13-norizoprenoidi, ali postoje i drugi fenolni spojevi poput antocijanina koji mogu biti u vezanom obliku. Osim toga, grožđe koje je tijekom dozrijevanja bilo u prisutnosti dima može uz aktivnost β -glukozidaza osloboditi i neke nepoželjne hlapljive spojeve poput krezola, gvajakola i siringola (Zhang i sur. 2021.).

Enzimi β -glukozidaze najčešće se koriste za oslobađanje aroma muškatinih sorti obzirom na visoki udio vezanih oblika aromatskih spojeva u tim sortama. González-Pombo i sur. (2014.) u svom radu navode otpuštanje monoterpena (α -terpineola, geraniola i linalol oksida A-C) kao i C13-norizoprenoida (vomifoliola i 3-okso- α -ionola) nakon tretmana sa imobiliziranim glukozidazama. Navodi se značajno povećanje njihovih koncentracija u odnosu na one iz kontrolnog vina. Posebno se istaknuo geraniol koji je nakon tretmana prešao mirisni prag detekcije. Spagna i sur. (2000.) također navode značajno oslobađanje terpena. Posebno ističu terpeneske alkohole (citronelol, nerol i geraniol) kojim se koncentracija povećala više nego onim tercijskim (linalol, α -terpineol). Ovi rezultati objašnjavaju se s nešto manjom selektivnosti β -glukozidaza prema tercijskim alkoholima. Nakon terpena, C13-norizoprenoidi su spojevi koji najviše utječu na aromatski profil muškatinih vina. U radu de Ovalle, Brena i González-Pombo (2021.) istaknula se β -glukozidaza iz *Issachenkia terricole*. Pokazala je specifičnost prema C13-norizoprenoidnim aglikonima poput 3-okso-7,8-dihidro- α -ionola, 3-okso- α -ionola i vomifoliola. González-Pombo i sur. (2014.) navode kako se osim terpena i C13-norizoprenoida, koncentracije drugih aromatskih skupina poput estera nisu mijenjale. Suprotno tome Villena, Iranzo i Pérez (2007.) utvrđuju kako se kod 'Muškata' tretiranog komercijalnim enzimima postižu više razine etil oktanoata u odnosu na enzime porijeklom iz kvasaca što može prouzročiti smanjenje kvalitete vina. Rezultati istraživanja novo otkrivenih sojeva kvasaca i metoda imobilizacije enzima pokazuju pozitivne potencijale za oslobađanje aroma u muškatinim sortama. U radu (González-Pombo i sur. 2011.) navodi se potencijal *Issatchenkia orientalis* soja kvasaca poznatog po svojim multi tolerantnim svojstvima. Izolirani enzim pokazao je dobru aktivnost u uvjetima viših koncentracija etanola i glukoze. Utjecao je na značajno povećanje C13-norizoprenoida i terpena, a značajno je utjecao i na povećanje fenola u odnosu na druge sojeve. U slučaju fenola posebno se istaknulo povećanje 4-vinilgvajakola, spoja koji vinu daje začinske arome. Gueguen i sur. (1997.) su aromu 'Muškata' pokušali povećati upotrebom *Candida molischiana* 35M5N β -glukozidazom imobiliziranom na Duolite A-568 smolu. Efikasnost imobilizacije iznosila je 86%, a tretmani su bili gotovi za manje od 24 sata. Enzimski tretman značajno je utjecao na povećanje nekih spojeva poput nerola, geraniola, linalola, γ -terpinena, 2-feniletanola i benzilnog alkohola. U istraživanju umreženih agregata ko-imobiliziranih β -glukozidaza (combi-CLEAs), Ahumada i sur. (2016.) otkrili su kako je ovaj način imobilizacije enzima povoljan u oslobađanju aroma iz muškatinih vina. Enzim je pokazao veliku stabilnost i trajnost, a ujedno i najveće otpuštanje aroma između svih testiranih

enzima. Koncentracije terpena, posebice linalola, nerola i geraniola, značajno su porasle, što je od velike važnosti, pogotovo kod muškatih sorti za koje su ove arome tipične. Nakon provedenih istraživanja, senzorne analize pokazale su značajne razlike između kontrolnih i tretiranih vina kojim se prepisuju intenzivnije voćne i cvjetne arome, što potvrđuje utjecaj promjene koncentracije terpena i ostalih spojeva na aromu i kvalitetu vina (González-Pombo i sur. 2014.).

Osim pozitivnog utjecaja na oslobađanje aroma, β -glukozidaze mogu prouzročiti i neke negativne promjene. Te se promjene najčešće uočavaju kod crnih vina zbog utjecaja na tvari boje. Wightman i sur. (1997.) istražili su utjecaj komercijalnih enzima na boju 'Pinota crnog' i 'Cabernet sauvignona'. Dva su od 4 enzima prouzročila značajnu destrukciju ukupnih monomernih antocijanina kao i individualnih pigmenta. Niti prisutnost aciliranih grupa na malvidin-3-glukozidima nije uspjelo inhibirati utjecaj enzima. Osim toga, u uzorcima u kojim je došlo do degradacije antocijanina javile su se i veće količine polimernih antocijanina. Povećanjem koncentracije enzima povećale su se i štete u vinima. Odabirom primjerenog enzima i vremena inokulacije mogu se te negativne promjene smanjiti ili u potpunosti zaobići, te utjecati na povećanje koncentracija ostalih pozitivnih spojeva. U istraživanju Wang i sur. (2013.) ispitivali su tri različite β -glukozidaze na vinu 'Cabernet Gernischta' i to BG1 i BG2 iz *Trichospora Asagiia* te AS iz *Aspergillus niger*. BG1 enzim imao je najbolji učinak na aromatske spojeve, dok je najmanje utjecao na antocijanine i gubitak boje. BG2 je suprotno tome značajno utjecao na tvari boje, imao je veću aktivnost na hidrolizu delfinidin-3-O-glukozida, peonidin-3-O-glukozida i petunidin-3-O-glukozida. Zhang i sur. (2021.b) istraživali su potencijal BGL0224 β -glukozidaze, dobivene iz *Oenococcus oeni* bakterije, za povećanje aroma kod 'Cabernet sauvignon' vina. Dodavanje BGL0224 prije fermentacije značajno je utjecalo na povećanje koncentracija nekih aromatskih spojeva koji su pronađeni u čak 15 puta većim količinama u odnosu na kontrolu. Povećanjem koncentracije srednje-lančanih i dugo-lančanih etilnih estera te terpena pridonijelo je stvaranju tropskih, voćnih i cvjetnih aroma 'Caberneta'.

Osim kod muškatih sorti, vezane oblike aromatskih spojeva moguće je pronaći i kod drugih sorata u nešto nižim koncentracijama. Bez obzira na sortu, β -glukozidazna aktivnost je u većini radova usmjerena na oslobađanje terpena i C13-norizoprenoida. Hu i sur. (2016.) istraživali su β -glukozidaznu aktivnost ne-*Saccharomyces* kvasaca *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia membranifaciens* i *Rhodotorula mucilaginosa* u Kini, inače vrlo bogatoj regiji za proizvodnju enzima. Među njima posebno se istaknula *Hanseniaspora uvarum*, koja je značajno utjecala na povećanje nekih C13-norizoprenoida i terpena, potičući svježje, cvjetne, slatke, bobičaste i orašaste aromatske karakteristike u vinu. Baffi i sur. (2011.) također su u svom radu istraživali novi soj ne-*Saccharomyces* kvasaca, *Sporidiobolus pararoseus*. Enzim je pokazao dobru tolerantnost na uvjete proizvodnje koje nalazimo tijekom fermentacije poput širokog raspona pH, niske temperature, više koncentracije šećera i alkohola. Značajno je utjecao na povećanje koncentracije nekih terpena, poput geraniola, linalola, α -terpineola i nerola, potvrđujući njegov potencijal kao novi enzim za oslobađanje aroma u vinarstvu. Osim terpena i C13-norizoprenoida, Gaensly i sur. (2015.) navode kako β -glukozidaze iz kvasaca utječu na

povećanje koncentracije *trans*-resveratrola u vinu bez mijenjanja kompozicije ili senzornih svojstava. Osim kvasaca, Baffi i sur. (2013.) navode gljivu *Aureobasidium pullulans* kao mogući izvor β -glukozidazne aktivnosti. Enzimi ove gljive pokazali su izvrsnu tolerantnost na proizvodne uvjete, stoga se preporučuju za korištenje kada ostali enzimi zakažu. Preparat je postigao zanimljive rezultate u povećanju koncentracije nekih terpena poput α -terpineola. Cabaroglu i sur. (2003.) navode povećanje razine hlapljivih spojeva monoterpena, C13-norizoprenoida i benzenskih derivata pektinaznim enzimskim preparatima na ne aromatičnom vinu sorte 'Emir'. Navode još i da je do najvećeg povećanja aroma došlo kod vina koji je bio u kontaktu sa kožicom bobice tijekom tretmana, ukazujući da se tijekom kontakta tekuće i krute faze oslobađaju glikozidaze iz kožice.

3. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno na dva vina, 'Muškat žuti' i 'Muškat ruža' iz berbe 2021. proizvođača Vina Matić iz Baškoti pokraj Višnjana. Zdravo grožđe oba muškata strojno je brano uz pomoć kombajna, te je nakon branja obrađeno isti dan. Na 'Muškat ruži' provedena je blaga maceracija u trajanju od 24 sata, dok je grožđe 'Muškata žutog' odmah prešano i spremljeno u inox tankove. Nakon taloženja pokrenuta je fermentacija oba mošta uz pomoć komercijalno dostupnih kvasaca. Nakon pretoka, a prije dodavanja bentonita u svrhu stabiliziranja vina, provedeno je istraživanje enzimima. Pratio se utjecaj komercijalno dostupnih enzima, Lallzyme Beta (Lallemend S.A.) i Endozym β -Split (AEB) na aromatski profil vina muškata.

Lallzyme Beta proizvođača Lallemend je enzim pektinaze sa snažnom glukozidaznom aktivnošću. Porijeklo mu je iz gljive *Aspergillus niger*. Koristi se radi povećanja aromatskog intenziteta vina. Na efikasnost tretmana ovim enzimom najviše utječe aromatski potencijal grožđa, pa se njegovo korištenje preporučuje kod bijelih sorti bogatih terpenskim spojevima poput 'Muškata' i 'Traminca'. Koristi ga se u dozi od 2,5-5 g/hl, a prije dodavanja u vino potrebno ga je otopiti u vodi u omjeru 1:20. Trajanje reakcije je najčešće 4-6 tjedana odnosno dok se ne primijete pozitivni učinci na vinu. Tada se uz pomoć bentonita zaustavlja njegova enzimska aktivnost. Zbog slabe aktivnosti prilikom veće količine glukoze preporučuje se koristiti ga nakon alkoholne fermentacije. Optimalna temperatura prilikom reakcije iznosi 12-20 °C (<https://www.lallemendwine.com/en/china/products/catalogue/enzymes/1/lallzyme-beta/>).

Endozym β -Split proizvođača AEB također je enzim pektinaze sa velikom β -glukozidaznom aktivnošću. Enzim pokazuje najbolje rezultate korištenjem pri kraju fermentacije kada je koncentracija šećera niža od 50 g/hl. Ovisno o temperaturi dodaje se u mošt ili vino u koncentraciji od 2-5 g/hl. Preporučuje se njegovo dodavanje pri temperaturi manjoj od 16 °C. Otporan je na koncentracije SO₂ koji se najčešće nalaze u vinu, međutim ne preporučuje se njegovo dodavanje zajedno sa otopinama sumpora (<https://www.aeb-group.com/en/endozysupsup-ss-split-4939>).

Prije dodavanja enzima obavljena je osnovna analiza vina, a nakon provedenog istraživanja obavljena je analiza aromatskih spojeva.



Slika 3.1. Enzimi korišteni u istraživanju, lijevo Lallzyme Beta, desno Endozym β -Split (Izvor: <https://www.lallemendwine.com/en/china/products/catalogue/enzymes/1/lallzyme-beta/>, <https://www.aeb-group.com/en/endozysupsup-ss-split-4939>, 2023.)

3.1. Osnovna analiza vina

Osnovna analiza uzoraka vina provedena je standardnim metodama objavljenima od strane OIV-a (Međunarodne organizacije za lozu i vino sa sjedištem u Parizu) u Laboratoriju za grožđe, mošt i vino Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo Agronomskog fakulteta u Zagrebu.

3.1.1. Određivanje alkoholne jakosti

Vrijednost alkoholne jakosti određena je u Kjeldahovoj tikvici metodom destilacije na način da se alkohol izdvojio iz vina kao destilat te se njegova specifična težina usporedila s specifičnom težinom vode na 20°C. Količina alkohola se iz dobivenih vrijednosti pomoću odgovarajućih tablica očitavala u g/L, a potom se iz tih vrijednosti očitao volumni % alkohola. Rezultat je dobiven očitavanjem vrijednosti na Riechardovim tablicama. Analiza koja je obuhvaćala određivanje specifične težine mjerena je metodom piknometrije.

3.1.2. Određivanje ukupnog suhog ekstrakta

Ukupni ekstrakt u vinu analiziran je iz ostatka nakon destilacije u Kjeldahovoj tikvici te je izražen u g/L dok je ekstrakt bez šećera (razlika između ukupnog suhog ekstrakta i ukupnog šećera) izmjeren nakon što je od količine ukupnog ekstrakta oduzeta količina rezidualnog šećera koji predstavlja vrijednost ekstrakta bez šećera minus vrijednost nehlapivih kiselina izraženih kao vinska.

3.1.3. Određivanje hlapljive kiselosti

Određivanja hlapljive kiselosti (izražena kao octena u g/L) dobiveno je njezinim odvajanjem iz uzorka putem destilacije u struji vodene pare. Nakon destilacije uzoraka vodenom parom, nekoliko kapi fenolftaleina dodano je u dobivene destilate koji su potom titrirani sa 0,1 M NaOH do pojave svijetlo ružičaste boje koja se morala zadržati barem 30 sekundi. Utrošak natrijevog hidroksida nakon pojave svijetlo ružičaste boje pomnožen je sa 1,2 čime je definirana koncentracija hlapljive kiselosti.

3.1.4. Određivanje ukupne kiselosti

Ukupna kiselost (g/L) određena je metodom direktne titracije koja se bazira na neutralizaciji svih kiselih frakcija otopinom neke lužine. Na osnovi utroška natrijevog hidroksida izračunata je ukupna kiselost pri čemu se bromtimolplavi koristio kao indikator.

3.1.5. Određivanje pH vrijednosti

pH vrijednost izmjerena je potenciometrijski pomoću pH metra sa skalom kalibriranom u jedinicama pH tako da omogućava mjerenja do točnosti od najmanje 0,05 pH jedinice.

3.1.6. Određivanje slobodnog, vezanog i ukupnog sumporovog dioksida

Određivanje slobodnog sumporovog dioksida (mg/L) u uzorcima vina mjereno je metodom po Paulu. Metoda se temelji na oslobađanju sumpornog dioksida iz zakiseljenog uzorka vina (dodatkom 25 %-tne ortofosforne kiseline) u struji zraka te njegovog vezanja na vodik peroksid pri čemu nastaje sumporna kiselina. Kao indikator koristi se mješavina metilen crvenog i metilen plavog te se titrira sa 0,01 M NaOH do pojave maslinasto zelene boje. Slobodni SO₂ dobije se množenjem utroška NaOH s 32.

Vezani SO₂ (mg/L) dobiven je ostavljanjem vina koje je nakon određivanja slobodnog sumpora ostalo u tikvici za kuhanje. Promijenjen je reagens u maloj apsorpcionoj tikvici, a zatim je pod tikvicu za kuhanje stavljen mali plamenik te je uz lagano vrenje ostavljen točno 10 minuta. Množenjem utrošenog 0,01 M NaOH s 32 dobije se vezani SO₂ u 1 litri vina. Ukupni SO₂ (mg/L) dobije se zbrajanjem vrijednosti slobodnog i vezanog SO₂.

3.1.7. Određivanje pepela u vinu

Pepeo u vinu određen je spaljivanjem ostalog taloga nakon isparavanja uzoraka u mufolnoj peći na 525 °C. Nakon spaljivanja masa pepela pomnožena je s 50 čime je dobiven rezultat u g/L.

3.2. Dodavanje enzima u vino

Vino oba Muškata punjeno je u litarske boce po 3 primjerka svake sorte. Jedna boca 'Muškata žutog' i 'Muškata ruže' ostavljena je sa strane bez dodavanja enzima kako bi kasnije služila kao kontrolni primjerak. U ostale su se boce dodavali enzimi. Po 1 gram Lallyzyme Beta i Endozym β-Split enzima dodano je u preostale boce na način da svaka boca sadrži jednu vrstu enzima. Otvore boca se nakon toga omotalo gumenom folijom kako bi se spriječio utjecaj zraka na vino. Boce su se zatim spremile u podrum na hladno i tamno mjesto kako bi se omogućila nesmetana provedba enzimske reakcije.



Slika 2.2. Uzorci nakon dodavanja enzima (Izvor: vlastita izrada autora, 2022.)

3.3. Određivanje hlapljivih aromatskih spojeva

Osam tjedana nakon dodavanja enzima provedena je analiza hlapljivih aromatskih spojeva. Kao i osnovna, provedena je u Laboratoriju za grožđe, mošt i vino Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Određivanje pojedinih aromatskih spojeva radilo se prema metodi Maslov i sur. (2017.).

Analiza hlapljivih spojeva vina provedena je primjenom vezanog sustava plinske kromatografije (Thermo Scientific Trace 1300) spektrometar masa (Thermo Scientific ISQ 7000) uz prethodnu izolaciju analita mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi u izvedbi klina (engl. Solid Phase Microextraction Arrow) pomoću automatiziranog sustava za pripremu uzoraka. Kao čvrsta faza korišten je sustav CAR-PDMS-DVB. U posudicu za uzorke dodano je 5 mL vina i 2,5 g NaCl. Prije same adsorpcije na čvrstu fazu, uzorak je uravnotežen pri 55 °C u trajanju od 10 minuta. Adsorpcija analita provedena je pri 55 °C u trajanju od 60 minuta. Desorpcija je provedena u injektoru tekućinskog kromatografa pri 250 °C u trajanju od 7 minuta. Kromatografska analiza provedena je pomoću TR-Wax kolone (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm) uz temperaturni program u rasponu temperatura od 40 do 210 °C. Snimanje spektara masa provedeno je praćenjem struje svih iona u rasponu od 20 do 500 m/z dok je energija elektrona bila 70 eV. Identifikacija je provedena pomoću usporedbe vremena zadržavanja, retencijskih indeksa te usporedbom spektara masa s onima u NIST 17 i Wiley 12 bazi podataka.



Slika 3.3. Uređaji Thermo Scientific Trace 1300 i Thermo Scientific ISQ 7000 korišteni za analizu hlapljivih aromatskih spojeva (Izvor: vlastita izrada autora, 2022.)

3.4. Senzorno ocjenjivanje

Kontrolna vina i vina nakon tretmana senzorno su ocjenjivana usporednom metodom. Korištena je metoda redoslijeda kako bi se ustanovio utjecaj provedenih tretmana na miris i okus vina, odnosno kako bi se ustanovile razlike među njima. Cilj 13 degustatora bio je poredati vina po kakvoći mirisa i kakvoći okusa od najboljeg (1) prema najslabijem (3). Vina su bila označena pod oznakom A, B ili C gdje je vino označeno kao A bilo kontrolno – ne tretirano, vino B tretirano Lallzyme Beta enzimom, a vino pod oznakom C tretirano Endozym β -Split enzimom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati osnovnih analiza

Oba analizirana vina potječu iz istog vinogorja, iste su godine berbe te oba pripadaju skupini kvalitetnih vina, međutim postoje određene razlike u kemijskom sastavu koje ih jako razlikuju. Najveća razlika među njima je svakako koncentracija reducirajućih šećera. 'Muškat žuti' sa samo 2,3 g/L reducirajućeg šećera pripada skupini suhih vina, dok se vino 'Muškat ruže' sa 42,0 g/L smjestilo u grupu poluslatkih vina. Osim toga, još jedna veća razlika među njima jest volumni postotak alkohola koji sadrže, odnosno srednje jakih 12,3 vol. % 'Muškata žutog' do jakih 13,9 vol. % kod 'Muškat ruže'. Velika se razlika dalje očituje i u količini ukupnog ekstrakta (22,4 g/L naprema 67,0 g/L) što najviše ovisi o velikoj razlici u količini šećera između njih. Vrijednosti ukupne i nehlapljive kiselosti te pH vrijednosti su kod oba vina bile slične, nešto više kod 'Muškata žutog', međutim zanemarivih razlika. Hlapljiva je kiselost bila viša kod 'Muškat ruže', no bez značajnije razlike. Značajnija razlika među muškaticima uočava se i u količini ukupnog SO₂ (118,0 mg/L prema 176,0 mg/L). Ta je razlika izražena zbog razlike vezanog SO₂ od 61 mg/L između dva analizirana vina. Količina pepela u oba vina bila je slična.

Tablica 4.1. Osnovni kemijski sastav vina 'Muškat žuti'

| | |
|---|--------|
| Specifična težina (20/20°C) | 0,9925 |
| Alkohol (g/L) | 97,4 |
| Alkohol (vol%) | 12,3 |
| Ekstrakt ukupni g/L | 22,4 |
| Šećer reducirajući g/L | 2,3 |
| Ekstrakt bez šećera g/L | 21,1 |
| Ekstrakt bez šećera i nehl. kiselosti g/L | 14,5 |
| Ukupna kiselost (kao vinska) g/L | 7,2 |
| Hlapljiva kiselost (kao octena) g/L | 0,47 |
| Nehlapljiva kiselost g/L | 6,6 |
| pH | 3,54 |
| SO ₂ slobodni mg/L | 9,0 |
| SO ₂ vezani mg/L | 109,0 |
| SO ₂ ukupni mg/L | 118,0 |
| Pepeo g/L | 2,47 |

Tablica 4.2. Osnovni kemijski sastav vina 'Muškat ruže'

| | |
|---|--------|
| Specifična težina (20/20°C) | 1,0079 |
| Alkohol (g/L) | 109,9 |
| Alkohol (vol%) | 13,9 |
| Ekstrakt ukupni g/L | 67,0 |
| Šećer reducirajući g/L | 42,0 |
| Ekstrakt bez šećera g/L | 26,0 |
| Ekstrakt bez šećera i nehl. kiselosti g/L | 20,7 |
| Ukupna kiselost (kao vinska) g/L | 6,1 |
| Hlapljiva kiselost (kao octena) g/L | 0,61 |
| Nehlapljiva kiselost g/L | 5,3 |
| pH | 3,44 |
| SO ₂ slobodni mg/L | 6,0 |
| SO ₂ vezani mg/L | 170,0 |
| SO ₂ ukupni mg/L | 176,0 |
| Pepeo g/L | 2,70 |

4.2. Rezultati analize hlapljivih aromatskih spojeva

4.2.1. Terpeni

Kod 'Muškata žutog' tretman Lallzyme Beta enzimom pokazao je povoljan učinak odnosno povećanje koncentracije svih analiziranih terpena osim *trans*-linalol oksida. Slično tome, tretman enzimom Endozym β -Split povećao je koncentraciju većine terpena osim α -terpinola, linalola, *trans*-linalol oksida i *cis*- β -Farnesena koji su zabilježili blagi pad koncentracije. Najveće se razlike između kontrolnih i tretiranih vina uočavaju kod D-limonena i β -Mircena kojima se koncentracija značajno povećala nakon tretmana sa oba enzima. Značajna povećanja koncentracije očituju se i kod α -terpinola te geranil formata prilikom tretiranja Lallzyme Beta enzimom, a kod tretiranja Endozym β -Split enzimom veće povećanje vidi se kod linalil izobutirata.

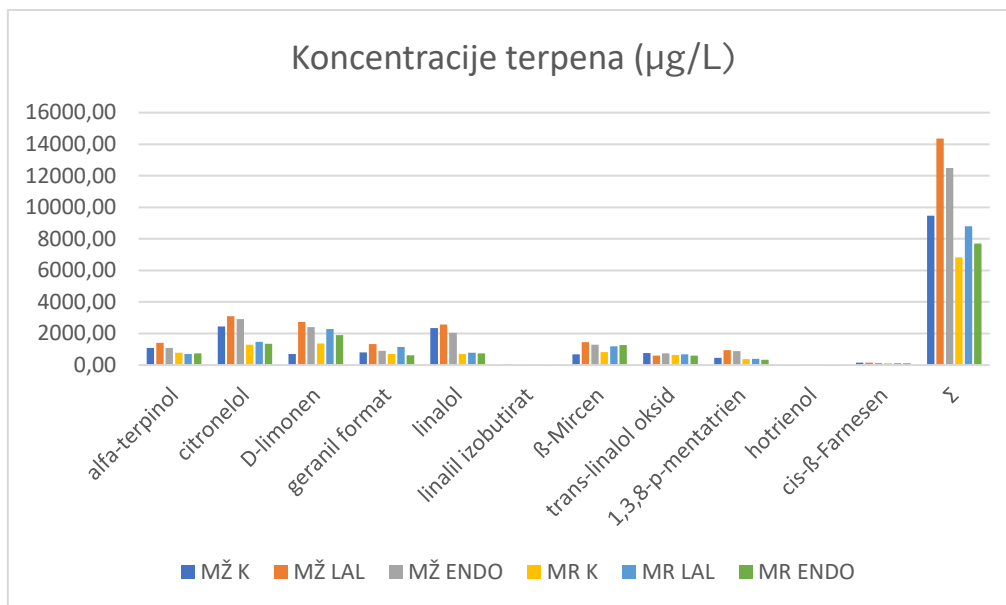
U slučaju 'Muškat ruže', tretiranjem Lallzyme Beta enzimom povećala se koncentracija svih terpena osim α -terpinola i *cis*- β -Farnesena. U odnosu na kontrolno vino značajnije razlike se uočavaju kod D-limonena i geranil formata. Kod tretiranja vina Endozym β -Split enzimom razlike su manje uočljive. Došlo je do pada koncentracije kod α -terpinola, geranil formata, *trans*-linalol oksida, 1,3,8-p-mentatriena te *cis*- β -Farnesena, dok se koncentracija ostalih terpena poput citronelola, D-limonena, linalola, linalil izobutirata i β -Mircena blago povećala. Za razliku od 'Muškata žutog' kod kojeg je u sva tri uzorka pronađen hotrienol, u 'Muškat ruži' njegove su koncentracije detektirane tek nakon tretiranja enzimima.

Koncentracija svih terpena zajedno bila je veća kod svih tretiranih vina, posebno kod vina tretiranih Lallzyme Beta enzimom.

Tablica 4.3. Koncentracija terpena prije i nakon tretiranja

| Terpeni | ODT (µg/L) | Mirisni deskriptori | MŽ K | MŽ LAL | MŽ ENOD | MR K | MR LAL | MR ENDO |
|---------------------|------------|---------------------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| α-terpinol | 330 | jorgovan, cvjetno, slatko | 1079,33 | 1406,97 | 1078,74 | 791,90 | 700,92 | 743,21 |
| citronelol | 40 | ruža | 2450,25 | 3089,53 | 2923,47 | 1290,09 | 1472,58 | 1356,84 |
| D-limonen | 200 | citrusno | 702,15 | 2738,91 | 2416,34 | 1377,74 | 2294,79 | 1896,77 |
| geranil format | | cvjetno, ruža | 810,11 | 1337,24 | 913,50 | 693,83 | 1155,41 | 615,65 |
| linalol | 25 | citrusno, cvjetno, slatko | 2355,87 | 2575,75 | 2046,01 | 700,95 | 787,41 | 737,96 |
| linalil izobutirat | | gorko-slatko, voćno | 22,73 | 24,76 | 40,54 | 14,27 | 17,17 | 17,06 |
| β-Mircen | 36 | zemljani, voćno | 685,55 | 1449,98 | 1293,10 | 826,19 | 1188,23 | 1272,63 |
| trans-linalol oksid | | | 754,82 | 600,24 | 747,83 | 647,34 | 674,15 | 605,44 |
| 1,3,8-p-mentatrien | | | 454,96 | 950,55 | 880,33 | 369,38 | 390,08 | 337,92 |
| hotrienol | 110 | cvjetno, svjež | 8,72 | 19,55 | 13,45 | n.a. | 11,49 | 11,73 |
| cis-β-Farnesen | | | 145,28 | 164,66 | 142,31 | 117,41 | 104,28 | 108,40 |
| Σ | | | 9469,77 | 14358,13 | 12495,61 | 6829,09 | 8796,50 | 7703,61 |

(MŽ- 'Muškat žuti'; MR- 'Muškat ruža'; K- kontrola; LAL- Lallzyme Beta; ENDO- Endozym B-Split)



Graf 4.1. Koncentracija terpena prije i nakon tretmana

4.2.2. C13-norizoprenoidi

U slučaju aromatskih spojeva poput C13-norizoprenoida na učinkovitost je očigledno najviše utjecala sorta vinove loze, pa se tako nakon tretiranja vina enzimima kod 'Muškata žutog' koncentracija gotovo svih spojeva povećala. Značajnija povećanja uočena su kod vitispirana A i vitispirana B prilikom tretiranja Lallzyme Beta enzimom, dok se jedini pad koncentracije vidi u slučaju TDN-a kod Endozym β-Split tretiranja.

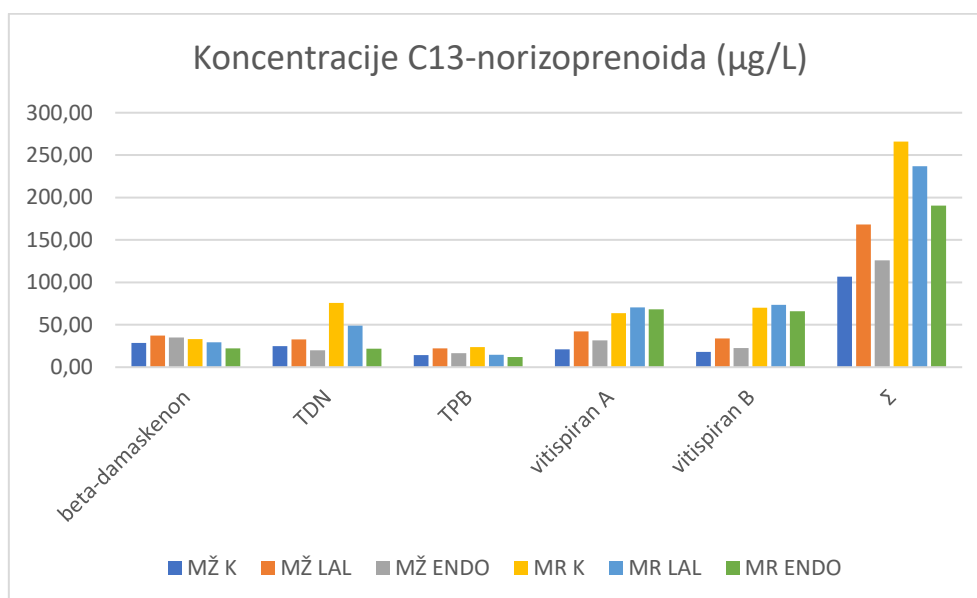
Suprotno tome, tretiranje 'Muškata ruže' pokazalo je lošije rezultate. Pad koncentracije β damaskenona, TDN-a i TPB-a izmjeren je nakon tretiranja sa oba enzima, dok se povećanje u istom slučaju uočava jedino kod vitispirana A. Koncentracije vitispirana B rastle su kod 'Muškata ruže' uz pomoć Lallzyme Beta, a padale dodavanjem Endozym β-Split enzima.

Suma svih C13-norizoprenoida prikazuje da se nakon tretmana enzimima samo kod 'Muškata žutog' koncentracija tih spojeva povećala, dok se u oba tretiranja kod 'Muškata ruže' koncentracija umanjila. Kao i kod koncentracije terpena, bolje rezultate u oslobađanju vezanih aromatskih spojeva pokazao je Lallzyme Beta enzim.

Tablica 4.4. Koncentracija C13-norizoprenoida prije i nakon tretiranja

| C13-norizoprenoidi | ODT (µg/L) | Mirisni deskriptori | MŽ K | MŽ LAL | MŽ ENDO | MR K | MR LAL | MR ENDO |
|--------------------|------------|------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| β -damaskenon | 7 | slatko, voćno, cvjetno | 28,55 | 37,39 | 35,15 | 33,09 | 29,33 | 22,33 |
| TDN | | kerozin, benzin | 24,67 | 32,75 | 19,97 | 75,63 | 48,91 | 21,97 |
| TPB | 0,40 | zeleno, pokošena trava | 14,17 | 22,24 | 16,69 | 23,53 | 14,62 | 12,15 |
| vitispiran A | | | 21,19 | 42,07 | 31,58 | 63,72 | 70,45 | 68,16 |
| vitispiran B | | | 17,98 | 33,82 | 22,66 | 69,99 | 73,67 | 65,83 |
| Σ | | | 106,55 | 168,27 | 126,05 | 265,96 | 236,98 | 190,44 |

(MŽ- 'Muškati žuti'; MR- 'Muškati ruža'; K- kontrola; LAL- Lallyzyme Beta; ENDO- Endozym B-Split)



Graf 4.2. Koncentracija C13-norizoprenoida prije i nakon tretmana

4.2.3. Aldehidi

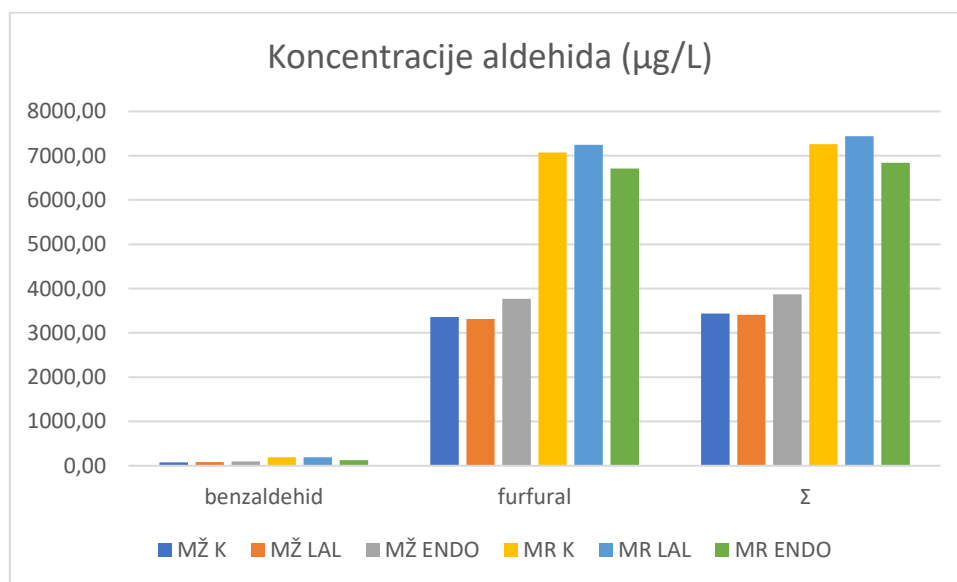
Iz skupine aldehida praćene su koncentracije benzaldehida i furfurala. Kod 'Muškata žutog' koncentracija benzaldehida je blago narasla, dok je koncentracija furfurala smanjena primjenom Lallyzyme Beta enzima pa se ukupna koncentracija aldehida smanjila u odnosu na kontrolno vino. Primjenom Endozym β-Splita došlo je pak do značajnijeg povećanja koncentracije oba aldehida pa tako i ukupne koncentracije.

U slučaju 'Muškat ruže' rezultati su suprotni. Povećanje koncentracije uočava se kod oba aldehida primjenom Lallyzyme Beta enzima, dok se smanjenje koncentracije benzaldehida i furfurala mjeri kod vina tretiranog Endozym β -Split enzimom.

Tablica 4.5. Koncentracija aldehida prije i nakon tretiranja

| Aldehidi | ODT ($\mu\text{g/L}$) | Mirisni deskriptori | MŽ K | MŽ LAL | MŽ ENDO | MR K | MR LAL | MR ENDO |
|-------------|-------------------------|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| benzaldehyd | | badem | 78,23 | 87,45 | 98,81 | 189,98 | 195,04 | 124,72 |
| furfural | | badem | 3361,21 | 3317,49 | 3772,00 | 7072,67 | 7246,06 | 6713,53 |
| Σ | | | 3439,43 | 3404,94 | 3870,81 | 7262,65 | 7441,10 | 6838,24 |

(MŽ- 'Muškat žuti'; MR- 'Muškat ruža'; K- kontrola; LAL- Lallyzyme Beta; ENDO- Endozym B-Split)



Graf 4.3. Koncentracija aldehida prije i nakon tretmana

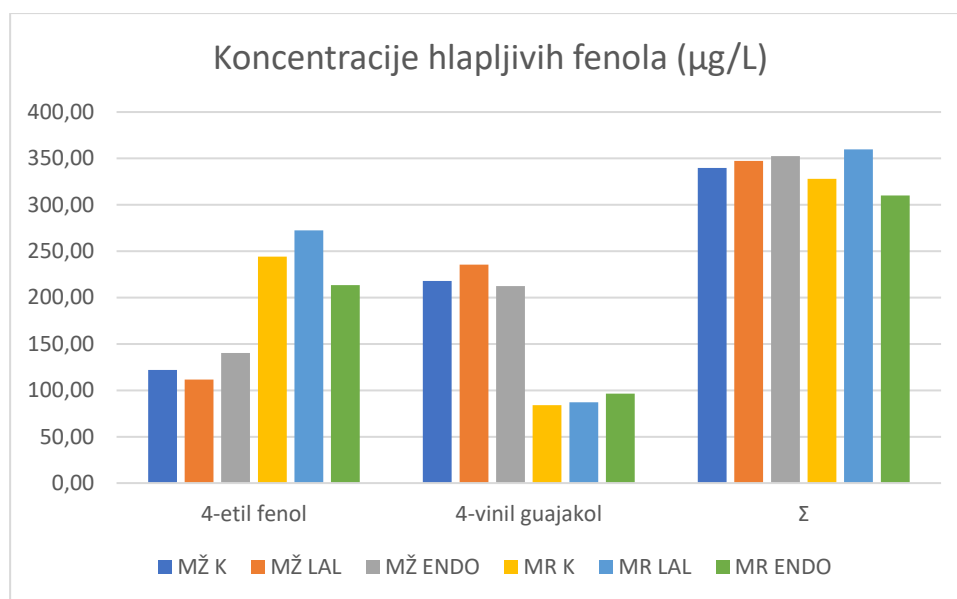
4.2.4. Hlapljivi fenoli

Od hlapljivih fenola praćene su koncentracije 4-etil fenola i 4-vinil guajakola. Primjenom Lallyzyme Beta enzima kod 'Muškata žutog' smanjila se koncentracija 4-etil fenola, a povećala ona 4-vinil guajakola. Endozym β -Split pokazao je obrnute rezultate. U slučaju 'Muškat ruže', kod vina tretiranog sa Lallyzyme Beta došlo je do povećanja koncentracije oba fenola, dok se primjenom Endozym β -Split smanjila koncentracija 4-etil fenola kao i ukupna suma hlapljivih fenola. Treba naglasiti da je koncentracija 4-etil fenola, spoja koji može imati negativan utjecaj na aromatski profil vina nije niti u jednom tretmanu bila iznad olfaktivnog praga detekcije.

Tablica 4.6. Koncentracija hlapljivih fenola prije i nakon tretiranja

| Hlapljivi fenoli | ODT ($\mu\text{g/L}$) | Mirisni deskriptori | MŽ K | MŽ LAL | MŽ ENDO | MR K | MR LAL | MR ENDO |
|------------------|-------------------------|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 4-etil fenol | 605 | animalno | 122,12 | 111,71 | 140,12 | 244,18 | 272,61 | 213,44 |
| 4-vinil guajakol | | dim | 217,74 | 235,55 | 212,55 | 83,88 | 87,13 | 96,47 |
| Σ | | | 339,87 | 347,26 | 352,67 | 328,06 | 359,73 | 309,91 |

(MŽ- 'Muškati žuti'; MR- 'Muškati ruža'; K- kontrola; LAL- Lallzyme Beta; ENDO- Endozym B-Split)



Graf 4.4. Koncentracija hlapljivih fenola prije i nakon tretmana

4.2.5. Masne kiseline

Koncentracija masnih kiselina u muškati se mijenjala ovisno o primijenjenom enzimu, pa se tako ukupna koncentracija kiselina značajno povećala kod 'Muškati žuti' tretmanom sa Lallzyme Beta, a smanjila primjenom Endozym β -Split enzima. Najveće se razlike u povećanju sa Lallzyme Beta enzimom mjere kod heksanske i oktanske kiseline. Koncentracije kod ostalih kiselina poput butanske i dekanske, također su povećane nakon tretmana, a jedino se koncentracija 2-etilheksanske kiseline smanjila nakon primjene Lallzyme Beta enzima. Suprotno tome, primjenom Endozym β -Split enzima, smanjenje koncentracije primjećuje se kod svih kiselina osim 2,4 heksadekanonske, izovalerijanske, dodekanske i oktanske kiseline kod kojih je došlo do blagog povećanja.

Primjenom enzima na vina 'Muškati ruža' došlo je do smanjenja koncentracije gotovo svih masnih kiselina. Najveće se smanjenje primjećuje kod heksanske kiseline prilikom tretiranja sa

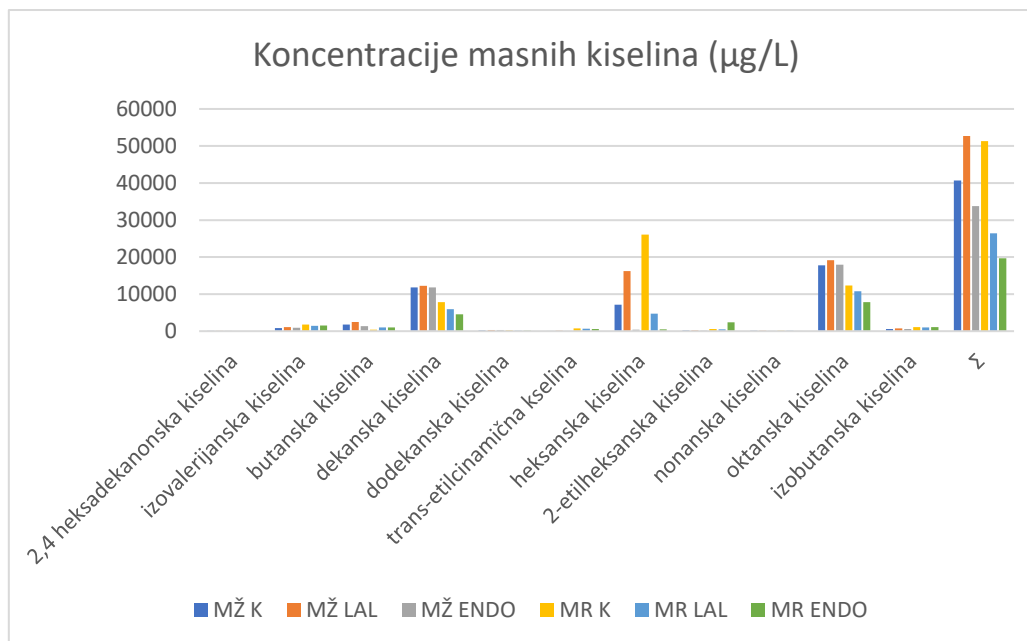
oba enzima, a jedina se povećanja koncentracija primjećuju kod butanske kiseline (oba enzima) te 2-etilheksanske i izobutanske kiseline kod primjene Endozym β -Split enzima.

Suma svih masnih kiselina prikazuje da je samo kod 'Muškata žutog' primjenom Lallzyme Beta enzima povećana koncentracija, a kod svih je ostalih tretiranja ukupna koncentracija bila manja.

Tablica 4.7. Koncentracija masnih kiselina prije i nakon tretmana

| Masne kiseline | ODT ($\mu\text{g/L}$) | Mirisni deskriptori | MŽ K | MŽ LAL | MŽ ENDO | MR K | MR LAL | MR ENDO |
|--------------------------------------|-------------------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 2,4 heksadekanonska kiselina | | | 17,367 | 24,166 | 39,372 | n.a. | n.a. | n.a. |
| izovalerijanska kiselina | 33 | slatko, užegao | 862,65 | 1126,78 | 965,44 | 1746,10 | 1440,34 | 1506,83 |
| butanska kiselina | 400 | užegao, sir | 1767,95 | 2494,37 | 1393,47 | 445,18 | 1017,09 | 990,12 |
| dekanska kiselina | 1000 | užegao, voštano | 11832,07 | 12254,09 | 11813,30 | 7868,66 | 5956,67 | 4536,29 |
| dodekanska kiselina | | | 235,63 | 306,59 | 282,40 | 263,45 | 187,53 | 139,67 |
| <i>trans</i> -etilcinamična kiselina | | | 96,91 | 102,78 | 96,40 | 718,09 | 690,50 | 574,90 |
| heksanska kiselina | 420 | sir, uljano | 7174,08 | 16207,51 | 430,59 | 26117,21 | 4715,18 | 520,23 |
| 2-etilheksanska kiselina | | | 219,57 | 201,46 | 110,32 | 549,29 | 471,06 | 2390,72 |
| nonanska kiselina | | | 119,91 | 121,42 | 83,51 | 176,53 | 152,10 | 86,71 |
| oktanska kiselina | 500 | užegao, uljano | 17749,58 | 19127,66 | 17974,32 | 12291,58 | 10770,05 | 7829,58 |
| izobutanska kiselina | | | 584,02 | 738,24 | 557,94 | 1099,34 | 988,04 | 1134,50 |
| Σ | | | 40659,71 | 52705,07 | 33747,06 | 51275,42 | 26388,55 | 19709,56 |

(MŽ- 'Muškat žuti'; MR- 'Muškat ruža'; K- kontrola; LAL- Lallzyme Beta; ENDO- Endozym B-Split)



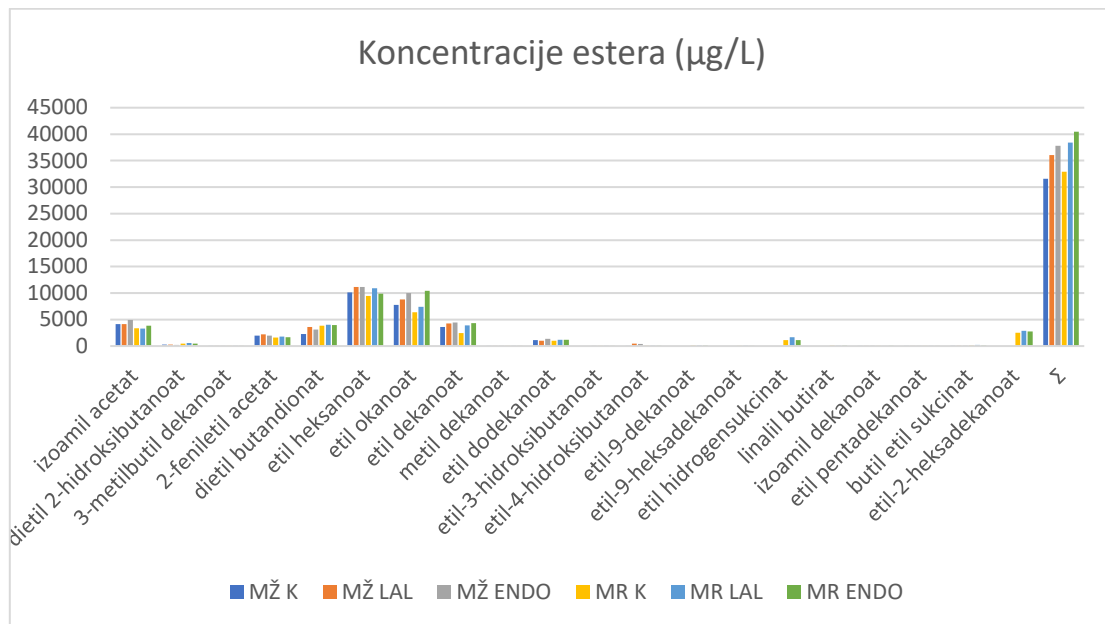
Graf 4.5. Koncentracija masnih kiselina prije i nakon tretmana

4.2.6. Esteri

Odlične rezultate nakon enzimskih reakcija pokazali su esteri. U slučaju 'Muškata žutog' tretiranjem Lallzyme Beta enzimom došlo je do znatnog povećanja koncentracije dietil butandionata, etil heksanoata, etil okanoat, etil dekanoat, metil dekanoata i etil-4-hidroksibutanoata. Manje razlike u povećanju uočavaju se kod dietil 2-hidroksibutanoata, 3-metilbutil dekanoata, 2-feniletal acetata, etil pentadekanoata i butil etil sukcinata, dok je do smanjenja koncentracije došlo kod izoamil acetata, etil dodekanoata i izoamil dekanoata. Korištenjem Endozym β -Split enzimom oslobađanje aroma bilo je još uspješnije pa su se tako koncentracije izoamil acetata, etil heksanoata, etil okanoata, etil dekanoata i izoamil dekanoata još više povećale. Nakon tretiranja ovim enzimom, određena koncentracija etil-3-hidroksibutanoata bila je detektirana dok je u kontrolnom vinu i uzorku sa drugim enzimom detekcija bila neuspješna. Koncentracije ostalih estera blago su rastle ili padale korištenjem Endozym β -Splita međutim bez vidljivijih razlika. U odnosu na rezultate 'Muškata ruže' spojeve poput etil-9-dekanoata, etil-9-heksadekanoata, etil hidrogensukcinata, linalil butirata i etil-2-heksadekanoata nije bilo moguće detektirati u kontrolnom vinu kao ni u tretiranim vinima 'Muškata žutog'.

Kod vina 'Muškata ruže' su pozitivne razlike uočene u koncentraciji etil heksanoata, etil okanoata, etil dekanoata i metil dekanoata primjenom oba enzima. Enzim Lallzyme Beta je veće razlike stvorio i kod etil-9-heksadekanoata i etil hidrogensukcinata, dok je primjenom Endozym β -Splita povećanje vidljivo kod izoamil acetata te izoamil dekanoata. U slučaju ostalih estera, utvrđen je blagi rast ili pad koncentracija.

Gledajuću ukupnu koncentraciju svih estera zajedno, primjećuje se da se korištenjem Endozym β -Split enzima povećala koncentracija estera, dok je ta pozitivna razlika sa Lallzyme Beta enzimom bila manje izražena.



Graf 4.6. Koncentracija estera prije i nakon tretmana

Tablica 4.8. Koncentracija estera prije i nakon tretiranja

| Esteri | ODT (µg/L) | Mirisni deskriptori | MŽ K | MŽ LAL | MŽ ENDO | MR K | MR LAL | MR ENDO |
|---------------------------|------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| izoamil acetat | 30 | banana | 4146,78 | 4125,01 | 4919,97 | 3350,87 | 3321,42 | 3852,05 |
| dietil 2-hidroksibutanoat | | | 262,66 | 272,41 | 192,65 | 478,85 | 592,70 | 428,21 |
| 3-metilbutil dekanooat | | | 14,30 | 23,23 | 18,75 | 16,41 | 16,22 | 17,56 |
| 2-feniletal acetat | 250 | ruža, med | 1956,42 | 2216,43 | 1967,60 | 1615,88 | 1804,36 | 1661,69 |
| dietil butandionat | | | 2276,98 | 3598,33 | 3094,63 | 3845,23 | 4021,62 | 3965,85 |
| etil heksanoat | 80 | voćno, slatko | 10147,57 | 11134,10 | 11147,99 | 9463,18 | 10898,21 | 9909,68 |
| etil okanoat | 250 | voćno, slatko | 7786,99 | 8778,06 | 10003,64 | 6376,76 | 7409,77 | 10425,38 |
| etil dekanooat | 200 | cvjetni | 3624,91 | 4243,02 | 4464,82 | 2436,04 | 3903,25 | 4322,80 |
| metil dekanooat | | | 13,42 | 27,87 | 14,90 | 16,85 | 34,10 | 40,96 |
| etil dodekanooat | | | 1122,83 | 987,26 | 1367,18 | 1005,23 | 1171,86 | 1212,96 |
| etil-3-hidroksibutanoat | 20 000 | voćni | n.d. | n.d. | 23,13 | 6,99 | 9,88 | 10,97 |
| etil-4-hidroksibutanoat | | | 53,36 | 481,99 | 371,58 | 80,11 | 87,56 | 89,25 |
| etil-9-dekanooat | | voćni | n.d. | n.d. | n.d. | 128,56 | 129,68 | 128,87 |
| etil-9-heksadekanooat | | | n.d. | n.d. | n.d. | 49,05 | 73,00 | 59,62 |
| etil hidrogensukcinat | | | n.d. | n.d. | n.d. | 1135,75 | 1685,85 | 1130,50 |
| linalil butirat | | cvjetni | n.d. | n.d. | n.d. | 155,86 | 123,13 | 155,41 |
| izoamil dekanooat | | | 30,28 | 29,08 | 77,71 | 14,84 | 60,52 | 103,37 |
| etil pentadekanooat | | | 52,35 | 59,35 | 40,22 | 34,43 | 29,05 | 22,46 |
| butil etil sukcinat | | | 89,65 | 90,21 | 88,02 | 157,66 | 211,77 | 163,30 |
| etil-2-heksadekanooat | | voćni | n.a. | n.a. | n.a. | 2516,63 | 2847,00 | 2775,48 |
| Σ | | | 31578,49 | 36066,34 | 37792,78 | 32885,16 | 38430,93 | 40476,37 |

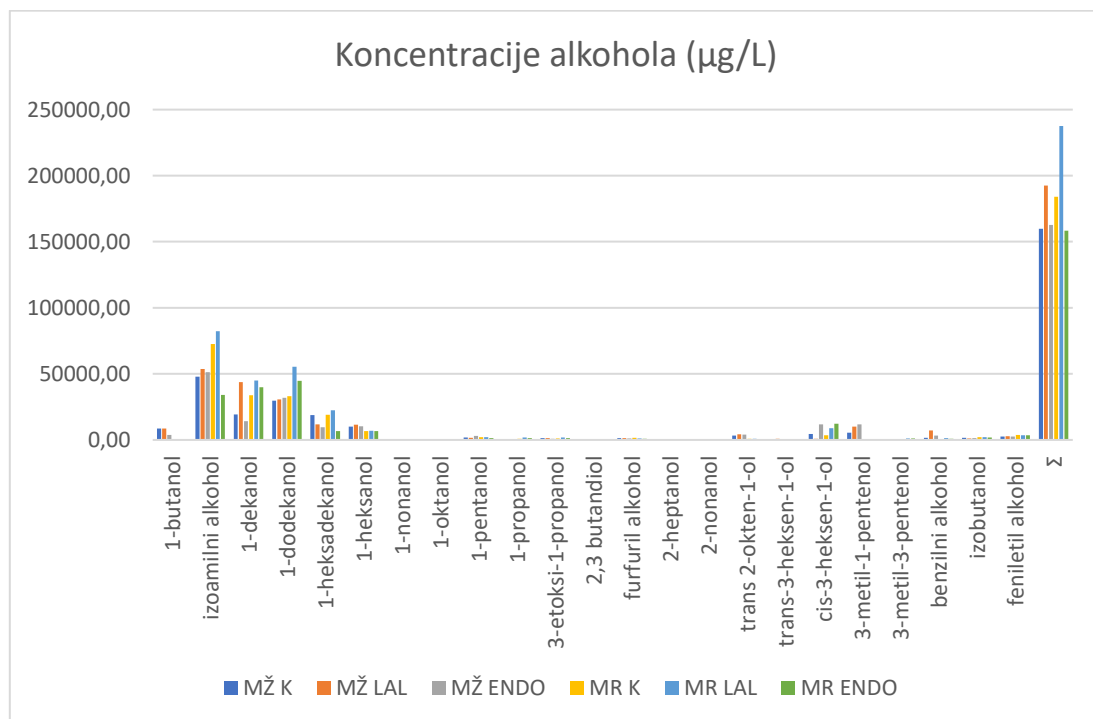
(MŽ- 'Muškat žuti'; MR- 'Muškat ruža'; K- kontrola; LAL- Lallzyme Beta; ENDO- Endozym B-Split)

4.2.7. Alkoholi

Enzim Lallzyme Beta je kod 'Muškata žutog' povećao koncentracije izoamilnog alkohola, 1-dekanola, 3-metil-1-pentenola i benzilnog alkohola. Najveće smanjenje koncentracije mjeri se kod 1-heksadekanola te *cis*-3-heksen-1-ola, a koncentracija ostalih alkohola nisu se razlikovale u odnosu na kontrolno vino. Primjenom Endozym β -Split enzima najveće je povećanje koncentracije izmjereno kod izoamilnog alkohola, 1-pentanola, *cis*-3-heksen-1-ola, 3-metil-1-pentenola, 3-metil-3-pentenola i benzilnog alkohola. Najveći pad koncentracije izmjeren je kod 1-butanola, 1-dekanola i 1-heksadekanola. Kod koncentracije ostalih alkohola promijene nisu bile naglašene.

Kod 'Muškat ruže' promjene u koncentraciji prilikom primjene Lallzyme Beta enzima utvrđene su kod izoamilnog alkohola, 1-dekanola, 1-dodekanola, 1-heksadekanola, 1-propanola, 3-etoksi-1-propanola te *cis*-3-heksen-1-ola. Među ostalim alkoholima nisu izmjerene veće razlike primjenom AEB-ovog enzima. Primjena Endozym β -Split enzima pokazala je veće, negativnije promjene. Većini su se alkohola smanjile koncentracije u odnosu na kontrolno vino, a posebice koncentracija izoamilnog alkohola. Među alkoholima kojima je izmjereno povećanje koncentracije mogu se izdvojiti 1-dekanol, 1-dodekanol, 1-propanol, 3-etoksi-1-propanol te *cis*-3-heksen-1-ol.

Sume alkohola prikazuju kako se primjenom Lallzyme Beta enzima koncentracija ukupnih alkohola povećala kod oba 'Muškata', dok se primjenom enzima Endozym β -Split koncentracija ukupnih alkohola blago povećala kod 'Muškata žutog' te smanjila kod 'Muškat ruže'.



Graf 4.7. Koncentracija alkohola prije i nakon tretmana

Tablica 4.9. Koncentracija alkohola prije i nakon tretiranja

| Alkoholi | ODT ($\mu\text{g/L}$) | Mirisni deskriptori | MŽ K | MŽ LAL | MŽ ENDO | MR K | MR LAL | MR ENDO |
|-----------------------------|-------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1-butanol | | | 8708,11 | 8521,15 | 3844,62 | n.a. | n.a. | n.a. |
| izoamilni alkohol | 65000 | alkohol, lak za nokte | 47885,17 | 53810,25 | 51184,32 | 72672,78 | 82185,28 | 33965,37 |
| 1-dekanol | 5000 | kruška, voštano, ljubičica | 19381,29 | 43641,39 | 14171,79 | 33771,01 | 44876,33 | 39888,25 |
| 1-dodekanol | | | 29790,11 | 30678,83 | 31957,97 | 33130,58 | 55413,36 | 44620,58 |
| 1-heksadekanol | | | 18706,10 | 11785,04 | 9640,14 | 18923,72 | 22436,17 | 6790,84 |
| 1-heksanol | 8000 | trava | 10177,22 | 11544,32 | 10428,28 | 6628,86 | 6871,94 | 6632,08 |
| 1-nonanol | | | 72,15 | 79,18 | 80,42 | 35,19 | 63,00 | 66,26 |
| 1-oktanol | | | 89,97 | 140,08 | 117,43 | 91,72 | 101,59 | 85,94 |
| 1-pentanol | | | 1867,22 | 1664,95 | 2976,32 | 1998,67 | 2087,17 | 1464,79 |
| 1-propanol | | | n.a. | n.a. | n.a. | 942,94 | 1936,02 | 1463,05 |
| 3-etoksi-1-propanol | | | 1478,75 | 1314,64 | 882,37 | 1133,34 | 1916,04 | 1258,32 |
| 2,3 butandiol | | | 126,66 | 261,92 | 160,43 | 586,83 | 391,79 | 396,83 |
| furfuril alkohol | | | 1259,43 | 1237,57 | 1106,72 | 1673,42 | 1102,35 | 889,21 |
| 2-heptanol | 70 | voćno, herbalno | 47,23 | 45,81 | 46,96 | 34,43 | 27,22 | 30,61 |
| 2-nonanol | | | 38,10 | 48,33 | 61,58 | 28,70 | 44,28 | 21,92 |
| <i>trans</i> -2-okten-1-ol | | | 3375,66 | 4299,81 | 3929,71 | 976,34 | 829,06 | 670,79 |
| <i>trans</i> -3-heksen-1-ol | 1000 | trava | 751,40 | 889,87 | 589,07 | 494,64 | 508,75 | 521,49 |
| <i>cis</i> -3-heksen-1-ol | 40 | trava, zeleno | 4436,95 | 917,73 | 11835,79 | 3566,47 | 8880,03 | 12259,28 |
| 3-metil-1-pentenol | | | 5590,09 | 9978,14 | 11717,51 | n.a. | n.a. | n.a. |
| 3-metil-3-pentenol | | | 236,24 | 350,24 | 506,97 | 739,82 | 1180,71 | 1138,17 |
| benzilni alkohol | | | 1501,60 | 7242,37 | 3295,58 | 730,90 | 1278,21 | 774,31 |
| izobutanol | | | 1668,88 | 1219,27 | 1464,30 | 2099,92 | 2038,31 | 1908,56 |
| feniletil alkohol | 14000 | cvjetno, ruža, med | 2508,17 | 2764,77 | 2611,91 | 3676,48 | 3499,90 | 3447,97 |
| Σ | | | 159696,50 | 192435,65 | 162610,18 | 183936,75 | 237667,49 | 158294,64 |

(MŽ- 'Muškat žuti'; MR- 'Muškat ruža'; K- kontrola; LAL- Lallzyme Beta; ENDO- Endozym B-Split)

4.3. Rezultati senzornog ocjenjivanja

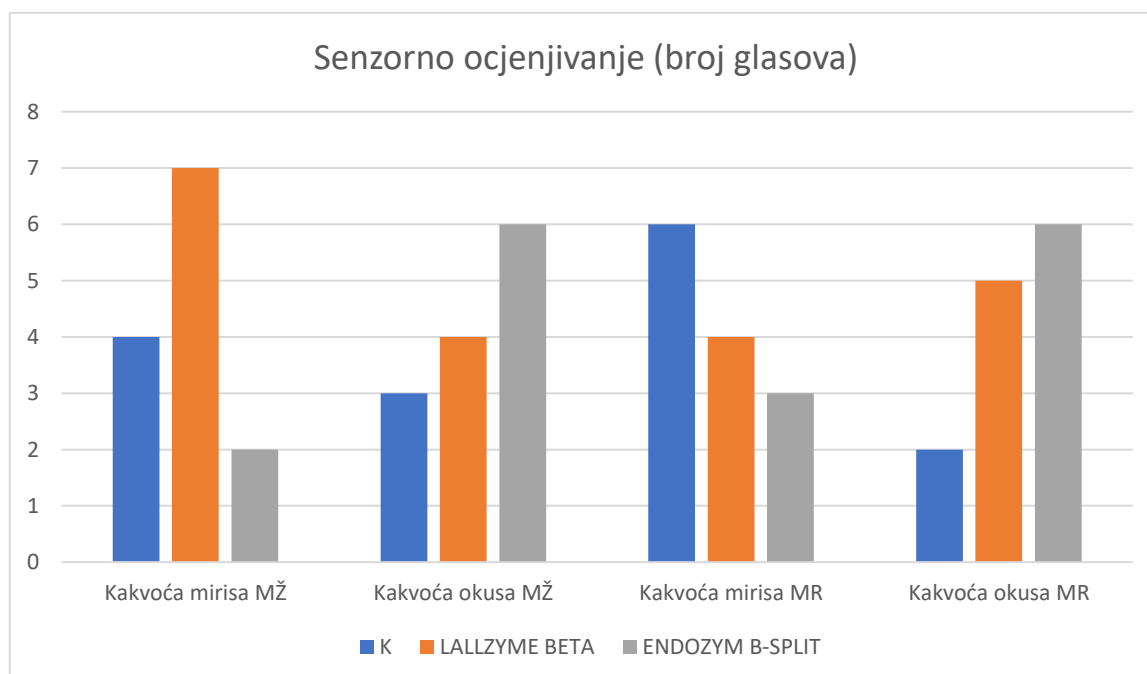
Cilj senzornog ocjenjivanja bio je utvrditi razlike između kontrolnih i tretiranih vina te među njima izabrati najbolje vino primjenom metode redosljeda.

Pri ocjenjivanju kakvoće mirisa vina 'Muškata žutog' čak 7 ocjenjivača odabralo je vino tretirano Lallzyme Beta enzimom kao najbolje, a samo dvoje ocjenjivača izabralo je vino tretirano Endozym β -Split enzimom. 4 ocjenjivača je kontrolno vino ocijenilo kao vino sa najboljim mirisom.

Kod ocjenjivanja kakvoće okusa, kao okusom najbolje vino izdvojeno je vino tretirano Endozym β -Split enzimom koje je u izboru mirisa dobilo najmanje glasova. Vino nakon primjene Lallzyme Beta enzima prikupilo je 4 glasa, a kontrolno je vino okusom ocijenjeno kao najlošije sa 3 glasa.

Utjecaj enzima na kakvoću mirisa vina 'Muškat ruže' se očito ocjenjivačima nije svidio. Kao mirisom najbolje vino sa 6 glasova odabrano je kontrolno vino bez utjecaja enzima. Drugo mjesto sa 4 glasa zauzelo je vino tretirano Lallzyme Beta enzimom, a treće ono tretirano Endozym β -Splitom (3 glasa).

U ocjenjivanju kakvoće okusa vina 'Muškat ruže' prevladalo je vino tretirano enzimom Endozym β -Split (6 glasova). Kontrolno je vino okusom bilo najlošije sa samo 2 glasa, dok je vino tretirano Lallzyme Beta enzimom bilo pri vrhu sa 5 glasova.



Graf 4.8. Rezultati senzornog ocjenjivanja

4.4. Rasprava

Kod svih vina tretiranih enzimom dogodila se promjena u očekivanom smjeru, odnosno koncentracija većine aromatskih spojeva se povećala.

Istraživane sorte već su u startu sadržavale značajne koncentracije terpena iznad praga detekcije. Muškatne su sorte prirodno bogate ovim spojevima, a nakon primjene enzima ta su vina bila još intenzivnija u mirisu i okusu. U oslobađanju terpena od prekursora najbolje se pokazao enzim Lallzyme Beta kod vina obje sorte. U slučaju 'Muškata žutog' najviše je utjecao na povećanje koncentracije spojeva poput D-limonena, β -Mircena, α -terpinola te geranil formata čime je vino poprimilo jači intenzitet mirisa na cvijeće, citruse, jorgovane i slatko. Kod vina 'Muškat ruže' Lallzyme Beta enzim također je pokazao najbolje rezultate u oslobađanju vezanih terpena poput D-limonena i geranil formata. Enzim Endozym β -Split pokazao je zadovoljavajuće rezultate pri oslobađanju terpena kod oba vina, međutim u značajno manjim koncentracijama u odnosu na Lallzyme Beta.

U drugoj skupini zanimljivih aromatskih spojeva poput C13-norizoprenoida opet je najbolje rezultate pokazao Lallzyme Beta enzim i to pogotovo kod vina 'Muškata žutog'. Povećanjem koncentracije C13-norizoprenoida vino je poprimilo jače slatke, voćne i cvjetne note. Enzim Endozym β -Split imao je male ili nikakve učinke na povećanje koncentracije C13-norizoprenoida pa se tretiranje vina ovim enzimom ne preporučuje ako je ovo ciljana skupina aromatskih spojeva.

Odličnu moć oslobađanja vezanih estera pokazala su oba enzima u slučaju oba vina, međutim prednost je ipak pokazao enzim Endozym β -Split. On je kod oba tretirana vina najviše povećao koncentraciju spojeva poput izoamil acetata, etil heksanoata, etil okanoata, etil dekanata i izoamil dekanata čime su vinu povećane arome banane, voća, slatkog i cvijeća. Lallzyme Beta enzim također je pokazao dobre rezultate pri povećanju arome cvijeća i voća u vinu, međutim u znatno manjem intenzitetu u odnosu na drugi ispitan enzim.

Na promijene u koncentraciji aldehida i hlapljivih fenola enzimi nisu imali većeg utjecaja pa samim time nisu niti značajnije utjecali na miris i okus ispitanih vina. Spojevi poput 4-etil fenola i 4-vinil guajakola nakon tretmana i dalje su ostali ispod praga detekcije, stoga nisu negativno djelovali na vina.

Količina analiziranih kiselina pokazala je da ispitanim enzimima ova skupina aromatskih spojeva nije najpoželjnija. Samo se primjenom Lallzyme Beta enzima kod 'Muškata žutog' njihova koncentracija povećala, dok se u ostalim ispitivanjima koncentracija značajno smanjila što je u nekim slučajevima bolje kako bi se izbjegli intenzivni mirisi i okusi na užeglo, voštano i sir.

U slučaju alkohola, najveće povećanje koncentracije utvrđeno je kod izoamilnog alkohola koji može biti vrlo neugodan, međutim koncentracija nakon tretmana je i dalje bila ispod praga detekcije. Lallzyme Beta enzim je utjecao na povećanje koncentracije 1-dekanola, 3-metil-1-

pentenola, 1-dodekanola, 1-heksadekanola, 1-propanola, 3-etoksi-1-propanola, cis-3-heksen-1-ola te benzilnog alkohola čime se u vinu pojačava intenzitet na travu, krušku i ljubičicu. Endozym β -Split slabo je ili nikako utjecao na oslobađanje vezanih alkohola pa se karakteristični mirisi i okusi slobodnih alkohola nisu pretjerano uočavali.

U više se znanstvenih radova spominje gubitak boje prilikom tretiranja crnih vina β -glukozidazama, međutim u ovom radu to nije bio slučaj. Crno vino 'Muškat ruže' nakon tretiranja sa oba enzima (Lallzyme Beta i Endozym β -Split) ostalo je iste kristalno čiste rubinske boje kao i kod kontrolnog vina.

Senzorno je ocjenjivanje na kraju pokazalo da su oba tretirana vina pokazala značajne razlike u odnosu na kontrolno vino. Tretirana su vina bila zadovoljavajućih mirisa i okusa, bez negativnih promjena odnosno mana. Degustatori su glasovima odlučili kako im se vino tretirano Lallzyme Beta enzimom više dopada po kakvoći mirisa, a vino tretirano Endozym β -Splitom po kakvoći okusa.

5. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenih istraživanja može se zaključiti da su korišteni enzimi odradili zadatak u očekivanom smjeru. Veliki se dio vezanih aromatskih spojeva nakon tretmana oslobodio i postao uočljiv.

Najznačajnije razlike uočene su pri povećanju koncentracija terpena i estera koji su u tretiranim vinima utjecali na formiranje novog aromatskog profila. U oslobađanju vezanih terpena boljim se pokazao enzim Lallzyme Beta koji je tretiranim vinima pojačao intenzitet cvijeća, citrusa i slatkog. S druge strane, enzim Endozym β -Split oslobodio je najviše vezanih estera pa su tretirana vina imala naglašenije arome banane, voća, slatkog i cvijeća.

U slučaju ostalih aromatskih spojeva poput C13-norizoprenoida, aldehida, hlapljivih fenola, kiselina i alkohola također je došlo do pozitivnog utjecaja. Vina su nakon tretiranja bila bogatija spojevima tih skupina, no bez značajnijih razlika koji bi pretjerano utjecali na kakvoću mirisa ili okusa vina.

Korišteni enzimi pokazali su kako su upravo aromatične sorte poput muškata idealne za njihov rad što je potvrđeno prilikom senzornog ocjenjivanja. Pojačani aromatski intenzitet nije bio negativno izražen, već je ugodno djelovao na sve parametre kakvoće.

Na kraju, zaključak je kako su oba enzima odradila svoj posao u oslobađanju vezanih aromatskih spojeva što se vidi u kemijskim analizama i senzornoj ocjeni, stoga se može potvrditi i preporučiti tretiranje vina ovim enzimima u svrhu stvaranja vina jačeg aromatskog intenziteta. Međutim potrebno je obratiti pažnju na odabir sorte koja će se tretirati, ciljanu skupinu aromatskih spojeva te koncentraciju enzima koji se dodaju kako bi se izbjeglo pretjerano oslobađanje aroma koje mogu negativno utjecati na kakvoću vina.

6. POPIS LITERATURE

1. Ahumada, Katherine, Ana Martínez-Gil, Yerko Moreno-Simunovic, Andrés Illanes, i Lorena Wilson. 2016. „Aroma Release in Wine Using Co-Immobilized Enzyme Aggregates“. *Molecules* 21 (11): 1485. <https://doi.org/10.3390/molecules21111485>.
2. Baffi, Milla A., Thaise Tobal, João Henrique, G. Lago, Rodrigo S.R. Leite, Maurício Boscolo, Eleni Gomes, i Roberto Da-Silva. 2011. „A Novel β -Glucosidase from *Sporidiobolus Pararoseus*: Characterization and Application in Winemaking“. *Journal of Food Science* 76 (7): C997–1002. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02293.x>.
3. Baffi, Milla A., Thaise Tobal, João Henrique Ghilardi Lago, Maurício Boscolo, Eleni Gomes, i Roberto Da-Silva. 2013. „Wine Aroma Improvement Using a β -Glucosidase Preparation from *Aureobasidium Pullulans*“. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 169 (2): 493–501. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9991-2>.
4. Barbagallo, Riccardo N, Giovanni Spagna, Rosa Palmeri, Cristina Restuccia, i Paolo Giudici. 2004. „Selection, Characterization and Comparison of β -Glucosidase from Mould and Yeasts Employable for Enological Applications“. *Enzyme and Microbial Technology* 35 (1): 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.005>.
5. Barbagallo, Riccardo N., Giovanni Spagna, Rosa Palmeri, i Sandra Torriani. 2004. „Assessment of β -Glucosidase Activity in Selected Wild Strains of *Oenococcus Oeni* for Malolactic Fermentation“. *Enzyme and Microbial Technology* 34 (3–4): 292–96. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.11.013>.
6. Bulić, S. (1949). Dalmatinska ampelografija. Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb.
7. Cabaroglu, Turgut, Serkan Selli, Ahmet Canbas, Jean-Paul Lepoutre, i Ziya Günata. 2003. „Wine Flavor Enhancement through the Use of Exogenous Fungal Glycosidases“. *Enzyme and Microbial Technology* 33 (5): 581–87. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00179-0).
8. Caliarì, Vinícius, Carolina Pretto Panceri, Jean Pierre Rosier, i Marilde T. Bordignon-Luiz. 2015. „Effect of the Traditional, Charmat and Asti Method Production on the Volatile Composition of Moscato Giallo Sparkling Wines“. *LWT - Food Science and Technology* 61 (2): 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.039>.
9. Cid, Alicia G, i Guillermo Ellenrieder. 2009. „Inhibition and Inactivation Evaluation of Exogenous Glycosidases in Wines Using P-Nitrophenylglycosides“. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89 (6): 1053–59. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3554>.

10. Claus, Harald, i Kiro Mojsov. 2018. „Enzymes for Wine Fermentation: Current and Perspective Applications“. *Fermentation* 4 (3): 52. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030052>.
11. Di Stefano, R. (2013): Gli aromi dei Moscati con particolare riferimento a quelli del Moscato Giallo. Atti Accademia Italiana della Vite e del Vino (http://www.aivv.it/Archivio/Atti/R053_1309_1055_DiStefano.pdf).
12. Gaensly, Fernanda, Bruna Carla Agustini, Gildo Almeida da Silva, Geraldo Picheth, i Tania Maria Bordin Bonfim. 2015. „Autochthonous Yeasts with β -Glucosidase Activity Increase Resveratrol Concentration during the Alcoholic Fermentation of Vitis Labrusca Grape Must“. *Journal of Functional Foods* 19 (prosinac): 288–95. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.041>.
13. González-Pombo, Paula, Laura Fariña, Francisco Carrau, Francisco Batista-Viera, i Beatriz M. Brena. 2011. „A Novel Extracellular β -Glucosidase from Issatchenkia Terricola: Isolation, Immobilization and Application for Aroma Enhancement of White Muscat Wine“. *Process Biochemistry* 46 (1): 385–89. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.016>.
14. González-Pombo, Paula, Laura Fariña, Francisco Carrau, Francisco Batista-Viera, i Beatriz M. Brena. 2014. „Aroma Enhancement in Wines Using Co-Immobilized Aspergillus Niger Glycosidases“. *Food Chemistry* 143 (siječanj): 185–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.107>.
15. Gueguen, Yannick, Patrick Chemardin, Stephane Pien, Alain Arnaud, i Pierre Galzy. 1997. „Enhancement of Aromatic Quality of Muscat Wine by the Use of Immobilized β -Glucosidase“. *Journal of Biotechnology* 55 (3): 151–56. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00069-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00069-2).
16. Hernández, L. F., J. C. Espinosa, M. Fernández-González, i A. Briones. 2003. „Beta-Glucosidase Activity in a Saccharomyces Cerevisiae Wine Strain“. *International Journal of Food Microbiology* 80 (2): 171–76. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00149-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00149-6).
17. Hu, Kai, Yi Qin, Yong-Sheng Tao, Xiao-Lin Zhu, Chuan-Tao Peng, i Niamat Ullah. 2016. „Potential of Glycosidase from Non- *Saccharomyces* Isolates for Enhancement of Wine Aroma: Wine Aroma Improvement by Glycosidase...“. *Journal of Food Science* 81 (4): M935–43. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13253>.
18. Huang, Rong, Fangfang Zhang, Xingmin Yan, Yi Qin, Jiao Jiang, Yanlin Liu, i Yuyang Song. 2021. „Characterization of the β -Glucosidase Activity in Indigenous Yeast Isolated from Wine Regions in China“. *Journal of Food Science* 86 (6): 2327–45. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15741>.

19. Hufner, Eric, i German Haßelbeck. 2017. „Application of Microbial Enzymes During Winemaking“. U *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, uredio Helmut König, Gottfried Uden, i Jürgen Fröhlich, 635–58. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5_26.
20. Jaeckels, Nadine, Stefan Tenzer, Achim Rosch, Gerhard Scholten, Heinz Decker, i Petra Fronk. 2015. „ β -Glucosidase Removal Due to Bentonite Fining during Wine Making“. *European Food Research and Technology* 241 (2): 253–62. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2451-9>.
21. Lee, Sae-Byuk, i Heui-Dong Park. 2020. „Isolation and Investigation of Potential Non-Saccharomyces Yeasts to Improve the Volatile Terpene Compounds in Korean Muscat Bailey A Wine“. *Microorganisms* 8 (10): 1552. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101552>.
22. Maicas, Sergi, i José Mateo. 2016. „Microbial Glycosidases for Wine Production“. *Beverages* 2 (3): 20. <https://doi.org/10.3390/beverages2030020>.
23. Maletić i sur. (2015): Zelena knjiga: Hrvatske izvorne sorte vinove loze. Državni zavod za zaštitu prirode. Zagreb
24. Martino, A., P.G. Pifferi, i G. Spagna. 1996. „Immobilization of β -Glucosidase from a Commercial Preparation. Part 2. Optimization of the Immobilization Process on Chitosan“. *Process Biochemistry* 31 (3): 287–93. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(95\)00066-6](https://doi.org/10.1016/0032-9592(95)00066-6).
25. Martino, A, C Schiraldi, A Di Lazzaro, I Fiume, G Spagna, P.G Pifferi, i M De Rosa. 2000. „Improvement of the Flavour of Falanghina White Wine Using a Purified Glycosidase Preparation from *Aspergillus Niger*“. *Process Biochemistry* 36 (1–2): 93–102. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00181-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00181-3).
26. Mateo, J. J., i R. Di Stefano. 1997. „Description of The β -Glucosidase Activity of Wine Yeasts“. *Food Microbiology* 14 (6): 583–91. <https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0122>.
27. Mirošević, N., Turković, Z. (2003). Ampelografski atlas. Golden marketing – Tehnička knjiga, Zagreb 4
28. Mojsov, Kiro. 2013. „USE OF ENZYMES IN WINE MAKING: A REVIEW“ 3 (9): 16.
29. Moreno-Arribas, M. Victoria, i M. Carmen Polo, ur. 2009. *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York, NY: Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5>.
30. Ovalle, Stefani de, Beatriz Brena, i Paula González-Pombo. 2021. „Influence of Beta Glucosidases from Native Yeast on the Aroma of Muscat and Tannat Wines“. *Food Chemistry* 346 (lipanj): 128899. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128899>.

31. Palmeri, Rosa, i Giovanni Spagna. 2007. „ β -Glucosidase in Cellular and Acellular Form for Winemaking Application“. *Enzyme and Microbial Technology* 40 (3): 382–89. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.007>.
32. Palomo, E, M Hidalgo, M Gonzalezvinas, i M Perezcoello. 2005. „Aroma Enhancement in Wines from Different Grape Varieties Using Exogenous Glycosidases“. *Food Chemistry* 92 (4): 627–35. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.025>.
33. Peršurić, Anita Silvana Ilak, Ana Težak Damijanić, Darko Saftić, Sanja Radeka, i Igor Jurinčić. 2015. „Analiza ponude vina u Istri i značaj Malvazije istarske“, 7.
34. Pogorzelski, Eugeniusz, i Agnieszka Wilkowska. 2007. „Flavour Enhancement through the Enzymatic Hydrolysis of Glycosidic Aroma Precursors in Juices and Wine Beverages: A Review“. *Flavour and Fragrance Journal* 22 (4): 251–54. <https://doi.org/10.1002/ffj.1784>.
35. Radeka, Sanja, Igor Lukić, i Đordano Peršurić. 2012. „Influence of Different Maceration Treatments on the Aroma Profile of Rosé and Red Wines from Croatian Aromatic cv. Muškat Ruža Porečki (*Vitis vinifera* L.)“. *Food Technol Biotechnol* 50.
36. Ribéreau-Gayon, P., J. N. Boidron, i A. Terrier. 1975. „Aroma of Muscat Grape Varieties“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23 (6): 1042–47. <https://doi.org/10.1021/jf60202a050>.
37. Romo-Sánchez, Sheila, María Arévalo-Villena, Esteban García Romero, Héctor L. Ramirez, i Ana Briones Pérez. 2014. „Immobilization of β -Glucosidase and Its Application for Enhancement of Aroma Precursors in Muscat Wine“. *Food and Bioprocess Technology* 7 (5): 1381–92. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1161-1>.
38. Schievano, E., M. D’Ambrosio, I. Mazzaretto, R. Ferrarini, F. Magno, S. Mammi, i G. Favaro. 2013. „Identification of Wine Aroma Precursors in Moscato Giallo Grape Juice: A Nuclear Magnetic Resonance and Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Tandem Study“. *Talanta* 116 (studenti): 841–51. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.07.049>.
39. Shoseyov, Oded, Ben-Ami Bravdo, Raphael Ikan, i Ilan Chet. 1988. „Endo- β -Glucosidase from *Aspergillus Niger* Grown on a Monoterpene Glycoside-Containing Medium“. *Phytochemistry* 27 (7): 1973–76. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80080-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80080-3).
40. Spagna, Giovanni, Riccardo N. Barbagallo, Angela Martino, i Pier Giorgio Pifferi. 2000. „A Simple Method for Purifying Glycosidases: α -l-Rhamnopyranosidase from *Aspergillus Niger* to Increase the Aroma of Moscato Wine“. *Enzyme and Microbial Technology* 27 (7): 522–30. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00236-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00236-2).
41. Todaro, Aldo, Rosa Palmeri, Riccardo N. Barbagallo, Pier Giorgio Pifferi, i Giovanni Spagna. 2008. „Increase of Trans-Resveratrol in Typical Sicilian Wine Using β -

- Glucosidase from Various Sources". *Food Chemistry* 107 (4): 1570–75. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.075>.
42. Van Rensburg, P., i I. S. Pretorius. 2000. „Enzymes in Winemaking : Harnessing Natural Catalysts for Efficient Biotransformations“. <https://doi.org/10.21548/21-1-3558>.
43. Villena, María Arévalo, Juan Francisco Úbeda Iranzo, i Ana Isabel Briones Pérez. 2007. „β-Glucosidase Activity in Wine Yeasts: Application in Enology“. *Enzyme and Microbial Technology* 40 (3): 420–25. <https://doi.org/10.1016/j.enzymtec.2006.07.013>.
44. Wang, Yuxia, Chao Zhang, Jiming Li, i Yan Xu. 2013. „Different Influences of β-Glucosidases on Volatile Compounds and Anthocyanins of Cabernet Gernischt and Possible Reason“. *Food Chemistry* 140 (1–2): 245–54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.044>.
45. Wightman, Jolynne D., Steven F. Price, Barney T. Watson, i Ronald E. Wrolstad. 1997. „Some Effects of Processing Enzymes on Anthocyanins and Phenolics in Pinot Noir and Cabernet Sauvignon Wines“. *American Journal of Enology and Viticulture* 48 (1): 39–48.
46. Yang, Hua, Guolin Cai, Jian Lu, i Encarna Gómez Plaza. 2021. „The Production and Application of Enzymes Related to the Quality of Fruit Wine“. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 61 (10): 1605–15. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1763251>.
47. Zhang, Jie, Tieru Wang, Ning Zhao, Junnan Xu, Yiman Qi, Xinyuan Wei, i Mingtao Fan. 2021.b „Performance of a Novel β-Glucosidase BGL0224 for Aroma Enhancement of Cabernet Sauvignon Wines“. *LWT* 144 (lipanj): 111244. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111244>.
48. Zhang, Pangzhen, Ruige Zhang, Sameera Sirisena, Renyou Gan, i Zhongxiang Fang. 2021.a „Beta-Glucosidase Activity of Wine Yeasts and Its Impacts on Wine Volatiles and Phenolics: A Mini-Review“. *Food Microbiology* 100 (prosinac): 103859. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103859>.
49. Zhang, Yang, Zhuo Min, Yi Qin, Dong-Qing Ye, Yu-Yang Song, i Yan-Lin Liu. 2019. „Efficient Display of *Aspergillus Niger* β-Glucosidase on *Saccharomyces Cerevisiae* Cell Wall for Aroma Enhancement in Wine“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67 (18): 5169–76. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00863>.

Popis korištenih izvora - poveznica:

1. Lallemand wine

(<https://www.lallemandwine.com/en/china/products/catalogue/enzymes/1/lallzyme-beta/>)
pristup 18.05.2023.

2. AEB Group (<https://www.aeb-group.com/en/endozysupsup-ss-split-4939>) pristup
18.05.2023.

7. PRILOZI

Popis slika:

| | |
|--|----|
| Slika 2.1. Enzimatska hidroliza (Palmeri i Spagna, 2007.) | 5 |
| Slika 3.1. Enzimi korišteni u istraživanju, lijevo Lallzyme Beta, desno Endozym β -Split (https://www.lallemandwine.com/en/china/products/catalogue/enzymes/1/lallzyme-beta/) (https://www.aeb-group.com/en/endozysupsup-ss-split-4939) | 15 |
| Slika 3.2. Uzorci nakon dodavanja enzima | 18 |
| Slika 3.3. Uređaji Thermo Scientific Trace 1300 i Thermo Scientific ISQ 7000 korišteni za analizu hlapljivih aromatskih spojeva | 19 |

Popis tablica:

| | |
|--|----|
| Tablica 4.1. Osnovni kemijski sastav vina 'Muškat žuti' | 20 |
| Tablica 4.2. Osnovni kemijski sastav vina 'Muškat ruže' | 21 |
| Tablica 4.3. Koncentracija terpena prije i nakon tretiranja | 22 |
| Tablica 4.4. Koncentracija C13-norizoprenoida prije i nakon tretiranja | 24 |
| Tablica 4.5. Koncentracija aldehida prije i nakon tretiranja | 25 |
| Tablica 4.6. Koncentracija hlapljivih fenola prije i nakon tretiranja | 26 |
| Tablica 4.7. Koncentracija masnih kiselina prije i nakon tretmana..... | 27 |
| Tablica 4.8. Koncentracija estera prije i nakon tretiranja | 28 |
| Tablica 4.9. Koncentracija alkohola prije i nakon tretiranja | 31 |

Popis grafova:

| | |
|---|----|
| Graf 4.1. Koncentracija terpena prije i nakon tretmana | 23 |
| Graf 4.2. Koncentracija C13-norizoprenoida prije i nakon tretmana | 24 |
| Graf 4.3. Koncentracija aldehida prije i nakon tretmana | 25 |
| Graf 4.4. Koncentracija hlapljivih fenola prije i nakon tretmana | 26 |
| Graf 4.5. Koncentracija masnih kiselina prije i nakon tretmana | 28 |
| Graf 4.6. Koncentracija estera prije i nakon tretmana | 29 |
| Graf 4.7. Koncentracija alkohola prije i nakon tretmana | 31 |
| Graf 4.8. Rezultati senzornog ocjenjivanja | 33 |

Životopis

Erik Matić rođen je u Puli 24. lipnja 1998., a odrastao je u selu Baškoti kraj Višnjana. Osnovnu školu završio je 2013. u Višnjanu, a iste je godine upisao Srednju školu Mate Balote u Poreču. Ondje je 2017. završio agrotehničarski smjer. Tijekom osnovne i srednje škole bavio se nogometom i sudjelovao je u mnogim natjecanjima poput onih iz geografije te informatike, a svih je 12 godina bio odličan učenik. Nakon uspješno položene državne mature, 2017. je upisao studij Hortikulture na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu kojeg je 2020. završio obranom završnog rada pod temom „Utjecaj filtracije i hladne stabilizacije na kemijski sastav i kvalitetu vinjaka“. Iste godine upisuje diplomski studij, smjer Hortikultura – Vinogradarstvo i vinarstvo na istom fakultetu.

Iskusni je korisnik talijanskoga jezika kojeg usavršava od samoga djetinjstva. Također je temeljni korisnik u govoru engleskoga jezika, a u njegovom pisanju i razumijevanju samostalni je korisnik. Engleski jezik usavršava tijekom studija čitajući stručnu literaturu. Osim jezicima, odlično se služi i računalom poznavajući MS Office paket.

Višegodišnji je dobitnik državne i STEM stipendije za najuspješnije studente u području biotehničkih znanosti. Dobitnik je i stipendije Miljenka Grgića kojom je 2022. obavljao stručnu praksu u Kaliforniji u vinariji Merry Edwards. Uz odgovorno izvršavanje studentskih obveza, također je član Mladih Krijesnice, grupe mladih osoba liječenih od malignih bolesti u djetinjstvu. U slobodno vrijeme obavlja pomoćne poslove u proizvodnji vina na vlastitom obiteljskom gospodarstvu „Matić vina“.