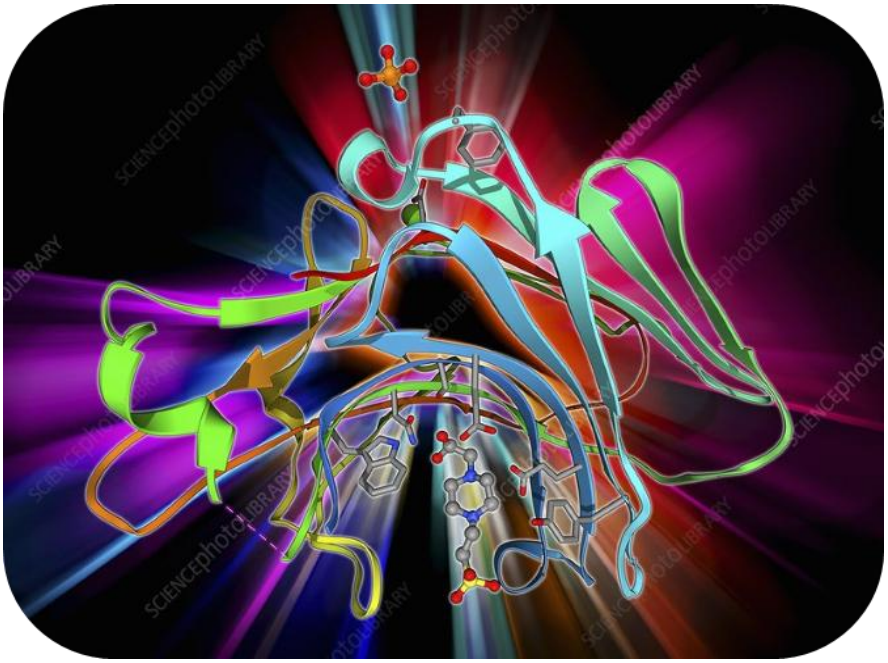
Od bobice do kapljice

Uloga enzima u vinarstvu



Josip Mikac

Uloga enzima u vinarstvu

Josip Mikac

Zagreb, 2026.

Uloga enzima u vinarstvu

Josip Mikac, mag. Chem.

Pregledni rad
(Review paper)
Osvrt na objavljene radove o stanju i razvoju enoloških enzima

Stručna potpora: dr. sc. Boris Mildner, dipl. ing. kemije
dr. sc. Iva Mikac, dipl. ing. kemije

Zagreb,2026.

Sažetak (Hrvatski)

Ovaj pregledni rad istražuje ulogu prirodnih i komercijalnih enzimskih preparata u modernoj enološkoj praksi, s posebnim naglaskom na detaljnu analizu prednosti njihove primjene te na osvrt na novu generaciju biokatalizatora. Kroz analizu svih faza proizvodnje – od muljanja i maceracije do stabilizacije i filtracije – rad prikazuje djelovanje specifičnih enzimskih skupina (pektolitički enzimi, glukanaze, glukozidaze). Glavne prednosti primjene ogledaju se u značajnom povećanju prinosa samotoka, ubrzanom bistrenju mošta, optimizaciji ekstrakcije polifenola i stabilizaciji boje kod crnih vina, kao i intenziviranju sortnih aroma. Posebna pozornost posvećena je novoj generaciji biokatalizatora, uključujući visoko pročišćene preparate bez neželjenih sporednih aktivnosti (poput cinamil-esteraze), imobilizirane enzime i biokatalizatore dobivene preciznom fermentacijom. Ovi napredni sustavi donose superiornu selektivnost, veću stabilnost u zahtjevnim uvjetima mikrovinifikacije te omogućuju smanjenje upotrebe sumporovog dioksida i agresivnih mehaničkih tretmana, čime se izravno unapređuje ekološka i ekonomska održivost proizvodnje uz očuvanje autentičnosti vina.

Ključne riječi: enzimi, vinarstvo, analiza prednosti, nova generacija biokatalizatora, maceracija, stabilizacija vina.

Abstract (English)

This review paper investigates the role of endogenous and commercial enzyme preparations in modern winemaking, with a specific emphasis on a comprehensive benefit analysis and a review of new-generation biocatalysts. By examining all production stages—from crushing and maceration to stabilization and filtration—the study details the mechanisms of specific enzyme classes (proteinases/pectinases, glucanases, glucosidases). The primary advantages of their application include significant increases in free-run juice yield, accelerated must clarification, optimized polyphenol extraction, colour stabilization, and enhanced varietal aroma release. Special attention is dedicated to new-generation biocatalysts, such as highly purified preparations free of undesirable side-activities (e.g., cinnamyl esterase), immobilized enzymes, and biocatalysts derived from precision fermentation. These advanced systems offer superior selectivity and higher stability under demanding microvinification conditions. Furthermore, they allow for a reduction in sulphur dioxide usage and minimize aggressive mechanical treatments, directly improving the environmental and economic sustainability of production while preserving the wine's authenticity.

Keywords: enzymes, winemaking, benefit analysis, new-generation biocatalysts, maceration, and wine stabilization.

Sadržaj

1. Uvod
• Povjesni i razvojni pregled upotrebe enzima u vinarstvu
• Svrha i ciljevi rada 1

2. Početak priprave vina - bobica grožđa i njeni strukturni i gradbeni elementi 3
2.1. Kožica 3
2.2. Pulpa 4
2.3. Struktura stijenke stanica bobica 4

3. Primjena enzima u vinarstvu 8
3.1. Enzimi koji pospješuju prinos, bistrenje i filtrabilnost mošta 10
3.2. Maceracija, polifenoli i maceracijski enzimi 10
3.2.1. Maceracija 10
3.2.2. Polifenoli 12
3.2.3. Maceracijski enzimi 17
3.3. Korištenje enzima u svrhu poboljšanja aroma vina 18
3.4. Uloga enzima u fazi dozrijevanja i starenja vina 18
3.5. Enzimi prirodno prisutni u grožđu 19
3.6. Enzimi koje stvaraju kvasci i drugi mikroorganizmi 20
3.7. Djelovanje enzima na gradbene polimere stanične stijenke 20

4. Klasifikacija enzima po funkcionalnosti 23
4.1. Pektinolitički enzimi – pektinaze 23
4.2. Celulolitički enzimi – celulaze 24
4.3. Glikozidaze, glukozidaze 25
4.4. Glukanaze 26
4.5. Hemicelulolitički enzimi – hemicelulaze 28
4.6. Proteaze 29
4.7. Lizozim 29
4.8. Ureaze 30
4.9. Upitno djelovanje lipaza 31
4.10. Nepovoljno djelovanje esterhidrolaza i fenoloksidaza 31

5. Praktični pristup korištenju enzima u vinarstvu 33
5.1. Predfermentacijske procedure i enzimi 34
5.1.1. Maceracija masulja, ocjeđivanje i prešanje mošta 35
5.1.2. Taloženje i bistrenje mošta 36
5.1.3. Ekstrakcija aromatičnih spojeva 38
5.2. Postfermentacijsko poboljšanje aromatičnosti i osjetilnog dojma vina 40
5.3. Dozrijevanje vina na talogu 42
5.4. Postfermentacijsko bistrenje i olakšavanje filtriranja 44
5.5. Sumarni pregled – enzimi i njihova uloga u vinarstvu 46

6. Enološki faktori i uvjeti koji utječu na efikasnost enzima 47

7. Ishodišni mikroorganizmi i forme komercijalnih enzimskih preparata 48

8. Zakonska regulativa 49

9. Razvoj enoloških enzima 50
9.1. Enzimi danas 50
9.2. Ciljevi razvoja novih vrsta enoloških enzima 51
9.3. Nove generacije biokatalizatora 52
9.3.1. Multienzimski sustavi 52
9.3.2. Imobilizacija i koimobilizacija 53
9.4. Primjena imobiliziranih enzima u vinarstvu 58
9.4.1. Temeljne značajke imobiliziranih enzima korisnih za vinarstvo 60
9.4.2. Dodavanje imobiliziranih enzima u fazi maceracije 62
9.4.3. Dodavanje imobiliziranih enzima u fazi fermentacije 62
9.4.4. Dodavanje imobiliziranih enzima u fazi bistrenja mošta i vina 63
9.4.5. Dodavanje imobiliziranih enzima u fazi stabilizacije i dozrijevanja vina 64
9.4.6. Usporedba metoda za stabilizaciju vina 68
9.4.7. Vrednovanje metoda za stabilizaciju proteina 72
9.4.8. Usporedna tablica tradicionalnih i modernih biokatalizatora 73

10. Rezime primjene enoloških enzima 74

11. Zaključna razmatranja 75

11. Izvornici 77

1. Uvod

• Povijesni i razvojni pregled upotrebe enzima u vinarstvu

Vino se rađa u vinogradu. Prirodna opstojnost ciklusa života loze završava rađanjem ploda, u kojem su koncentrirane energija sunca, voda kao medij bivanja i biogeni elementi koji osiguravaju rast gradbene strukture biljke. U bobicama, koje su čudo biokemijske složenosti, obitava izvor ponovne održivosti loze, sjemenke što čuvaju začetak novih ciklusa postojanja. No u njima se krije i bogatstvo slasti i opojnosti koje čovjek pretvara u vino, užitnu hranu za tijelo i dušu.

Priprava vina je povijesno umijeće, ali i znanost koja se razvijala tisućama godina, počevši od praktičnih pristupa (održavanje vinograda, načina branja, tehnika maceracije, vrenja i td.) razvijenih sa svrhom i namjenom ubiranja grožđa s trsja i pretvaranjem tog ploda u konačnici u vino. Noviji pristup vinovoj lozi (*Vitis vinifera*) i vinu poprimio je višestruku diversifikaciju i danas se temeljno dijeli na vinogradarstvo (znanost o vinovoj lozi i razvoju grozda) i enologiju (znanost o vinu i vinarstvu). Dodatno, fundamentalna molekularna i genetička znanja i znanja o fiziologiji bilja, kao i znanja o organizmima povezanim s nastankom vina (kvasci, bakterije) osiguravaju i omogućuju vinarskoj industriji stalno unapređivanje. Napredak je omogućen i zbog toga što vinarstvo danas drži korak i s interdisciplinarnim znanstvenim razvojem (biokemijom, molekularnom biologijom, prehrambenom tehnologijom, medicinom, ekologijom i dr.), uključivo i razumijevanjem uloge enzima, prirodnih biokatalizatora u biokemijskim procesima. Tehnološke inovacije u industriji vina prvenstveno su usmjerene u povećanje efikasnosti različitih tehnoloških procesa, ali i povećanje kvalitete vina.

Vino je proizvod koji nastaje kao rezultat djelovanja biokemijskih transformacija spojeva prisutnih u grožđu i moštu u procesu kontrolirane alkoholne fermentacije. Kvasci pretvaraju šećere u etanol i druge metabolite kao i u hlapljive i nehalapljive spojeve koje znatno utječu na osjetilnu percepciju vina (boju, osjetilni dojam, okusne i mirisne značajke), ali i u spojeve koji imaju pozitivno djelovanje na ljudsko zdravlje. Tradicionalno, fermentacija se odvija pod djelovanjem uzgojenih i selektiranih, ali i na grožđu prirodno prisutnih kvasaca. Bitne, tijekom fermentacije nastale promjene sastava i značajki vina, su posljedica djelovanja i enzima formiranih tijekom razvoja grožđa i enzima koje kvasci produciraju.

Napredak u biotehnologiji promijenio je i razumijevanje funkcije enzima u pojedinim fazama procesa vinifikacije, ali doveo i do korištenja komercijalnih enzimskih preparata. Komercijalni enzimi djeluju kao i prirodni na grožđu i u kvascima nastali enzimi, ali s većom efikasnošću i poboljšanom selektivnošću i većom stabilnosti pri vinifikaciji. Enzimi, u ulozi ubrzivača biokemijskih procesa, doprinose mnogim korisnim poboljšanjima, prvenstveno: povećanju prinosa mošta, lakšem ocjeđivanju samotoka, poboljšavaju osjetilni dojam i boju vina, skraćuju maceraciju, ubrzavaju bistrenje i taloženje, ubrzavaju stabilizaciju, a skraćuju i vrijeme i troškove filtracije.

Primjena topljivih enzima koji se direktno dodaju u mošt i vino ima i svoja ograničenja, prvenstveno promjenljivu stabilnost i nemogućnost ponovne, višekratne uporabe.

U novija vremena postignut je veliki napredak u otklanjanju nedostataka koje nastaju pri primjeni direktno topljivih enzima. Razvijene su nove tehnike i mehanizmi koje uključuju imobilizaciju i koimobilizaciju enzima. Imobilizirani enzimi u ulozi procesnih biokatalizatora imaju praktične za vinarstvo vrlo relevantne prednosti: produkciju vina u kojem nema zaostalih enzima–proteina, ponovljivu upotrebu enzima i primjenu u kontinuiranim procesima. To se naročito koristi pri masivnoj produkciji vina.

• Svrha i ciljevi rada

Ovaj pregledni rad (Review article) ima za cilj sustavno prikazati ulogu enzima kroz sve faze vinifikacije, valorizirati prednosti njihove primjene te istražiti potencijal naprednih biotehnoloških rješenja (pročišćenih, imobiliziranih genetski optimiziranih enzimskih kompleksa) koja obećavaju revoluciju u prilagodbi klimatski uvjetovanih promjena u vinogradarstvu i u održivosti i unapređenju modernog vinarstva.

2. Početak priprave vina - bobica grožđa i njeni strukturni i gradbeni elementi

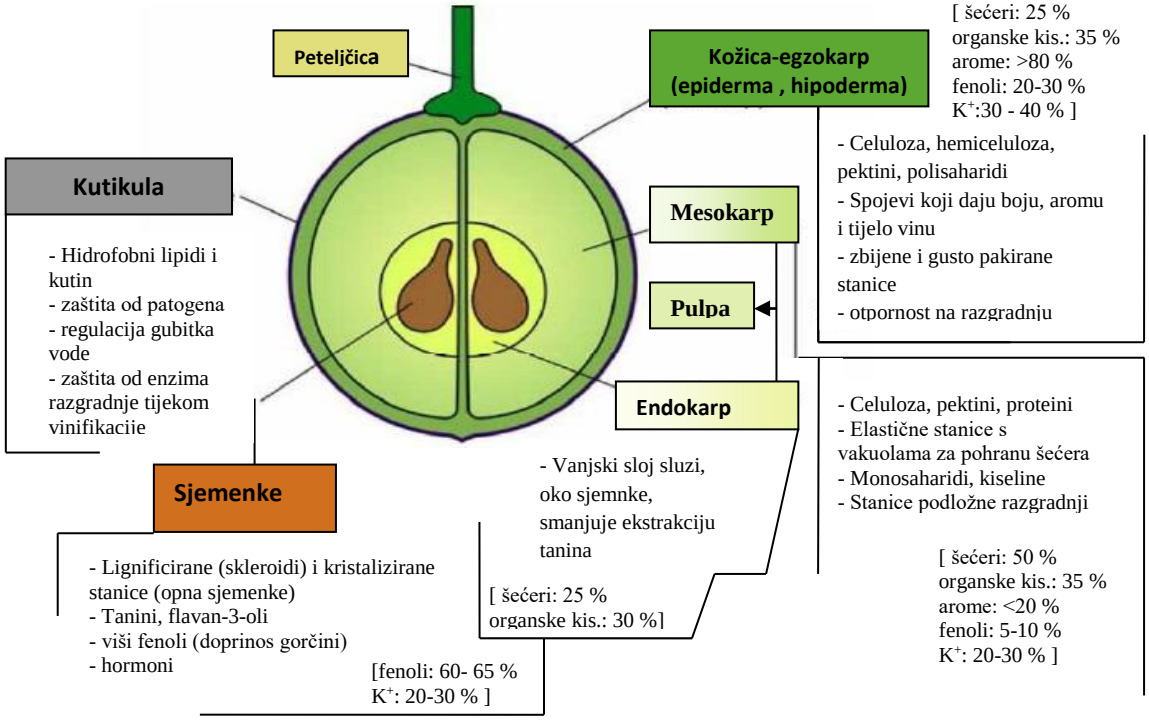
Ubrano grožđe je početak svakog procesa priprave vina te je stoga znanje o njegovoj prirodi kao izvorišnog materijala krucijalni faktor za svaki proces priprave vina i u konačnici za kvalitetu vina. Bobice grozda su organ biljke vinove loze u kojem je koncentrirano sve ono dobro što omogućuje pretvaranje ploda u vino.
Za građu bobice grožđa se može reći da ju tvore tri dominantne vrste tkiva: kožica, pulpa i sjemenke, Prikaz 2.1. Prikaz opisuje: strukturu tkiva bobice, ulogu staničnih stijenki i dominantne sastojke tkiva bobice. Sa stanovišta uspješne vinifikacije nužno je razumjeti što se u bobici krije, ali i što to štiti cjelovitost staničnih struktura bobice, kakav je sastav stjenke različitih kultivara, i što se događa kada se naruši integritet stanične strukture.

2.1. Kožica bobice (egzokarp) grožđa, u ukupnoj masi bobice sudjeluje s 5 do 10 % i ima ulogu hidrofobne barijere koja štiti grožđe od: fizičkih i klimatskih ozljeda, dehidracije, gljivičnih infekcija i UV zračenja. Kožicu bobice tvore tri superponirana, čvrsto povezana sloja. Prvi, vanjski sloj – **kutikula** sadrži kutin koji je prekriven hidrofobnim voskom. Međusloj–***epiderma***, sadrži jedan sloj ili dvosloj pločastih, tangencijalno izduženih stanica. Unutarnji sloj kožice – **hipoderma**, je sloj koji je najbliži pulpi–mezokarpu i tvore ga više staničnih slojeva. Stanice bliže epidermi su pravokutnog oblika, a one bliže pulpi su poligonalne.
Kutikula se sastoji od voštanog pokrova (lipida) utisnutog ili položenog na kutinsku matricu kožice. Kutin je netopljivi polisaharid, polimer N-acetil-D-glukozamina, otporan na mehaničko i toplinsko djelovanje. Bobicu grožđa voštani sloj štiti od vanjskih utjecaja, biotičkih i abiotičkih. Prilikom muljanja u masulju (komini) se na površinu kutinskog sloja (hidrofobnog) kožice veže zrak, a to onda ima za posljedicu nastajanja plivajućeg sloja, flotaciju masulja. Taj plutajući sloj, prisutan je tijekom procesa fermentacije mošta na masulju, posebice pri vinifikaciji crvenog vina. Prisutnost flotacijskog sloja zahtijeva primjenu neke od tehnologija potapanja u svrhu efikasnije maceracije cjelokupne mase masulja, a ujedno i u svrhu smanjenja oksidacije i kvarenja.
Među inim kutin onemogućuje egzogenim enzimima razgradnju i penetraciju u unutarnja tkiva bobice. No, to se mijenja nakon mehaničke razgradnje (muljanja) strukture bobice.

Broj staničnih slojeva kožice, veličina tih stanica i sastav staničnih stijenki variraju od kultivara do kultivara. Poznato je da se stjenke stanica epiderme i hipoderme sastoje od 30 % neutralnih polisaharida (celuloze, ksiloglukana, arabinana, galaktana, ksilanandmanana) težinski, a još oko 20 % tvore kisele pektinske komponente (62 % njih su metilesteri). Relativno novija istraživanja su iterativnim izračunima došla do preciznijih procjena udjela i vrsta polisaharida prisutnih u kožici bobica. Iz tih saznanja proizlazi da se polisaharidi sastoje od 57 do 62 mol % homogalakturona (HG), 6 do 14 mol % celuloze, 10 do 11 mol % ksiloglukana, 7 mol % arabinana, 4,5 do 5 mol % ramanogalaktana-RG-I, 3,5 do 4 mol % ramanogalaktana-RG-II, 3 mol % arabinogalaktana i 0,5 do 1 % manana. U ovom sloju se tijekom dozrijevanja akumuliraju i fenolni spojevi. Ti spojevi u procesu maceracije bivaju otpušteni u mošt i pozitivno doprinose kvaliteti vina i njenim osjetilnim značajkama, boji i aromi.

2.2. Pulpa (meso, mezokarp/endokarp) je dominantno tkivo za pohranu šećera (glukoze – grožđanog šećera i fruktoze – voćnog šećera) i organskih kiselina (vinske, jabučne, …). Stanične stjenke tkiva pulpe su izgrađene prvenstveno iz celuloze (dugolančanih polisaharida, glikozidički povezanih molekula glukoze), pektina (strukturnih biljnih heterogenih polisaharida, pretežito polimera galakturonske kiseline) i proteina (makromolekula, polimera aminokiselina). Pektini su vezani na celulozu, koja biljci daje čvrstoću, a oni joj daju fluidnost i elastičnost. Stjenke stanica pulpe sadrže više fruktoze, ramanoze i ksiloze, ali manje arabinoze, galaktoze, manoze i glukoze nego što ih sadrže hemicelulozom bogate stanične Stjenke kožice bobice. Stanice i tkivo pulpe se značajno povećavaju tijekom i nakon šare, gledano volumno. Istovremeno se povećavaju i stanice kožice, ali se kod njih povećava ploština, omjer površine stanica prema volumenu raste.

Unutar pulpe rastu i sjemenke čiju opnu tvore vrlo tvrde i netopljive lignificirane i kristalizirane stanice (skleroidi). Sjemenke sadrže visoke koncentracije fenolnih spojeva, tanina i flavan-3-ola. Većina tih fenola i tanina su vrlo opori i gorki pa njihova ekstrakcija u mošt i vino nije poželjna



Prikaz 2.1. Struktura tkiva bobice, uloga staničnih stijenki i dominantni sastojci bobice grožđa.

Preuzeto iz: Noronha H. (2010) i Yu Gao et al. (2019).

2.3. Struktura stijenke stanica bobica

Otključavanje matrice strukture stanica grožđane bobice (razgradnja staničnih struktura kožice i pulpe), maceracije njenih sastojaka (izvlačenje otpuštenih i otopljenih staničnih sastojina) te fermentacija tih sastojaka u vino nužni su preduvjet začetka vinifikacije.
Ti procesi imaju za cilj postići dostupnost kemijskim i biokemijskim sastojcima bobice.

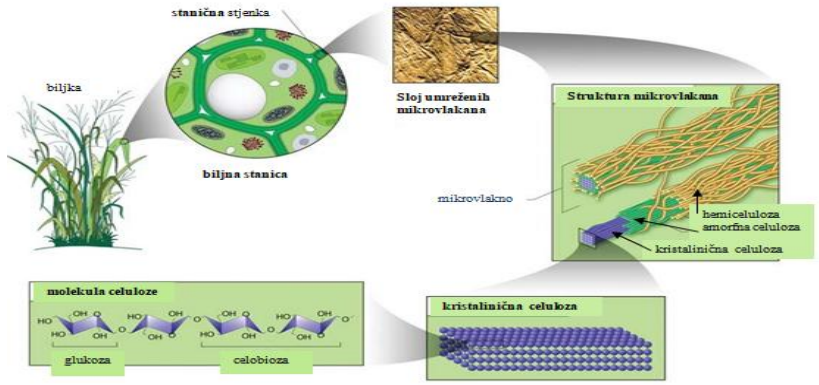
Stanice tkiva bobice su zaštićene staničnim stijenkama i membranama pretežito polimerne prirode (pektini, strukturni proteini, polifenoli–tanini), a unutrašnjost stanica sadrži metabolite: šećere, kiseline, hlapljive spojeve, pigmente i dr.

Razgradnja stanične stijenke i omogućavanje dostupa unutar staničnim sastojcima ubrzava se dodavanjem enzimskih preparata prirodnog (pretežito kvaščevog i gljivičnog) neškodljivog porijekla. Enzimi pospješuju: razgradnju strukture bobica, povećavaju volumen mošta, maceraciju (ekstrakciju pigmenta i metabolita), bistrenje i taloženje (smanjivanje viskoznosti mošta), povećavaju aromatičnosti, dozrijevanje vina, stabilizaciju i filtrabilnost. Ključni izazov u optimalnom izboru pogodnih enzima koji će ciljano, korisno i efikasno djelovati, za sada, nema apsolutno stručno pa donekle i iskustveno uporište prvenstveno zbog nedostatnog znanstveno utemeljenog znanja o sastavu i strukturi stanične stijenke tkiva bobice, ali i o mehanizmima djelovanja enzima pri varijabilnim uvjetima čestim u vinarstvu. No, enzimi zasigurno imaju ulogu poboljšanja i ubrzanja niza vinifikacijskih procesa.

Proučavanje strukture staničnih stijenki je izazov iz mnogih razloga. Jedan od značajnijih faktora složenosti proistječe iz činjenice da su strukture staničnih stijenki kompoziti višeg reda, kojeg tvore raznovrsni polimeri (npr. polisaharidi, glukoproteini, polifenolni polimeri). Sastav stijenke stanica bobica varira ovisno o: sortama loze, fazama rasta loze (različitost sastava bobica u vegetativnoj i generativnoj fazi), vrsti tkiva i vrsti pojedinačnih stanica (epidermalne, hipodermalne, mezokarpne, endokarpne i stanice sjemenke).

Celuloza, hemiceluloza, ksiloglukani, glukani, strukturni proteini i pektini su temeljni polimeri koji tvore strukturu stanične stijenke.
Celuloza je strukturni polisaharid čiju osnovu čine glikozidnom vezom međusobno povezane monomerne molekule glukoze. Osnovna struktura celuloze se sastoji od ravnih lanaca, koji međusobno mogu biti povezani vodikovim vezama, a više tako međusobno povezanih lanaca grade celulozna mikrovlakna. Celuloza je glavna strukturna komponenta staničnih stijenki biljaka, Prikaz 2.2. Osim celuloze u strukturne gradbene komponente biljnih staničnih stijenki pripadaju i hemiceluloza, strukturni proteini (ekstenzin) i lignin (neugljikohidratna makrobiomolekula, fenolne prirode, polimer fenilpropanoida)
Hemiceluloza je polisaharid čiju polimernu osnovu tvori više različitih šećera (osim glukoze dominiraju D-pentozni šećeri, pretežito ksiloza i arabinoze). Hemiceluloza se sastoji od kraćih lanaca šećernih monomera (ksiloglukana, glukana i ksilana) u odnosu na celulozu, a strukturno se razlikuju i po tome što je hemiceluloza razgranati polimer, a celuloza nerazgranati. Hemiceluloze su podložnije hidrolizi i imaju nešto veću topljivost. *Ksiloglukani* su polimeri čiji se osnovni lanac sastoji od ß-(1→4) vezom povezanih molekula glukoze i bočnih grana koje su po sastavu D-ksilozni lanci. *Glukani* su polimeri koji sadrže ß-piranoze. *Ksilani* su polisaharidi izgrađeni od β-1,4-vezan ksiloza (pentozni šećeri) s postraničnim granama α-arabinofuranoze i/ili α-glukoronskih kiselina. Ksilani se dodatno kategoriziraju u; (i) glukoronoksilane, (ii) arabinoksilane i (iii) glukoronoarabinoksilane. *Arabinogalaktani* su polimeri izgrađeni od monosaharida arabinoze i galaktoze.

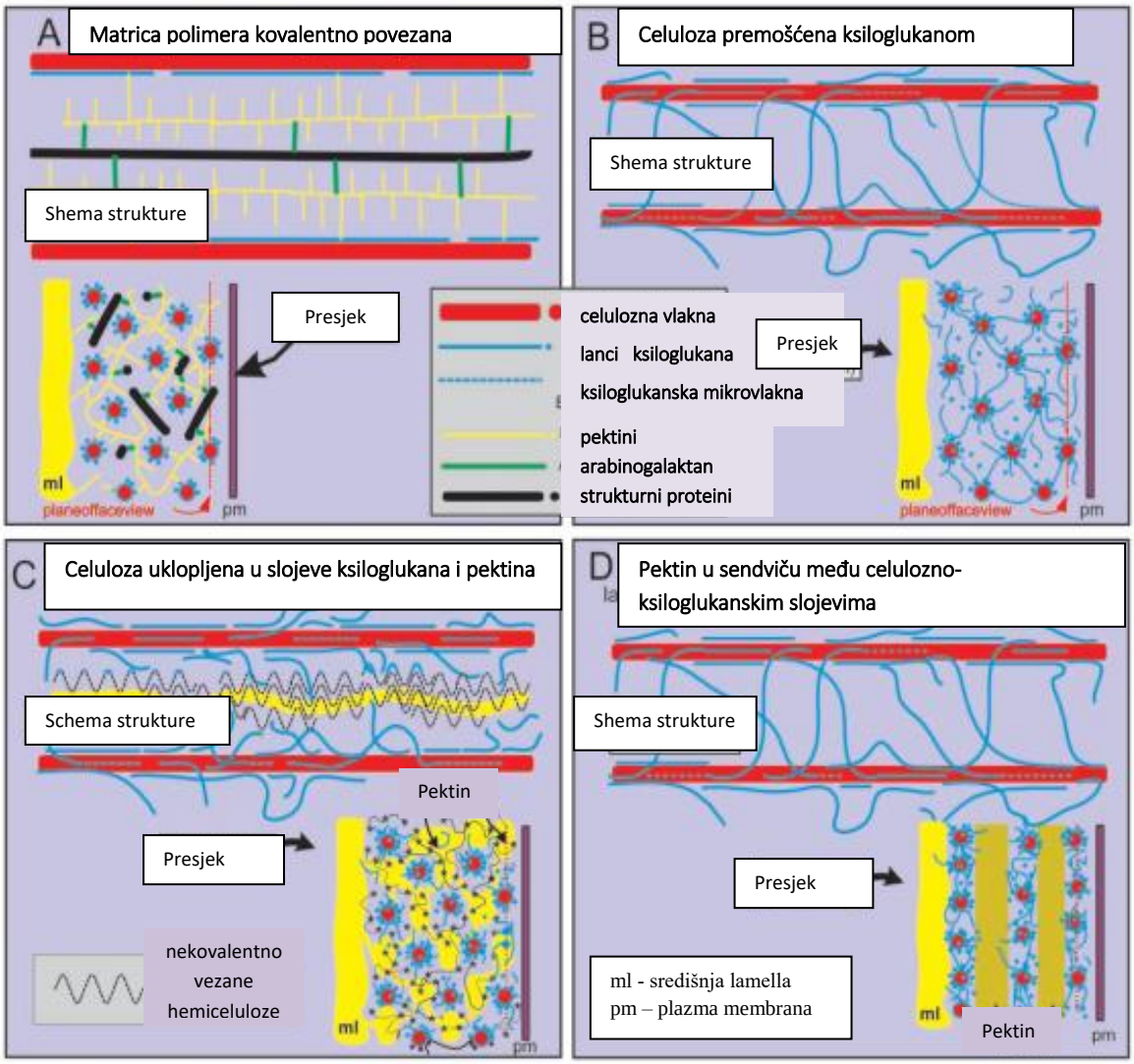
Strukturni proteini su makromolekule čija su osnova aminokiseline, a najznačajniji strukturni protein je ekstenzin koji je po sastavu glikoprotein bogat hidroksiprolinom.
Pektini su polisaharidi galakturonske kiseline. Pektin je polisaharid stanične stijenke koji omogućuje produženje stanične stijenke i rast biljaka.



Prikaz 2.2. Celuloza — uloga u građi bilja, strukturna uloga od makro do mikro motrišta i obrnuto: pozicija u biljnoj stanici, umrežena mikrovlakana stanične stijenke, struktura mikrovlakana, kristalinične forme celuloze, polimerna struktura celuloze (molekule glukoze i celobioze).

Preuzeto iz: Quiroz-Castaneda i Folch-Mallool (2013).

Za sada postoje dileme o efikasnosti i primjenjivosti različitih strukturalnih modela biljnih, staničnih stijenki. Ipak bar načelni uvid u strukturne modele pomaže da se objasne uloge pojedinih strukturnih polimera i mehanizmi dinamičkih promjena koje se s njima događaju tijekom razvoja grozda, ali i promjene izazvane djelovanjem vanjskih faktora. Alternativni modeli strukture stanične stijenke, prostorno locirane između središnjih međustaničnih lamela i stanične plazma membrane, na više načina opisuju i tumače moguće strukturne uloge i odnose gradbenih polimera, Prikaz 2.3. Različitost modela povlači za sobom i razlike u pristupu tumačenja koji je od tih modela primjereniji za razumijevanje strukture i mehanizama koji se u stjenici odvijaju, ali posljedično i koji je pristup razgradnji stijenke potencijalno najkorisniji. Svaki od tih modela opisuje ulogu temeljnih gradbenih polimera, njihov međusobni prostorni odnos i način njihovog povezivanja;
(a) *matrica polimera*: skup strukturnih elemenata (u usklađenom djelovanju) koji su međusobno povezani kovalentnim vezama. Dodatno je celuloza vodikovim vezama povezana s glukanima,
(b) *mreža spojnica*: pojedinačni ksiloglуganski lanac premošćuje prostor među celuloznim mikrovlaknima (isprepleteni celulozni lanci međusobno povezani vodikovim vezama) i spaja ih. Pektinski polisaharidi i strukturni protein nisu prikazani, ali i oni su tu i popunjavaju prostor među ksiloglukanskim lancima,
(c) *višeslojni model*: celuloza je presvučena slojevima pektina i ksiloglukana, koji su s celulozom povezani slabim vodikovim vezama,
(d) *slojevit model*: sloj pektinskog polisaharida razdvaja celulozno-ksiloglakanske lamele, u prostoru između plazma membrane (pm) i među stanične (središnje) lamele (ml).



Prikaz 2.3. Alternativni modeli struktura biljnih staničnih stijenki.

Preuzeto iz: Cosgrove (2001).

Efikasna razgradnja strukture bobica je ključna iz više razloga: bolja i uravnoteženija ekstrakcija poželjnih spojeva, veći prinos-randman mošta i samotoka, konzistentnija kvaliteta, poboljšanje tipičnih osjetilnih značajki pojedinih kultivara.

Tijekom zadnjih nekoliko dekada brojne su studije koristile novije analitičke metode (klasične su se najčešće oslanjale na kemijsko frakcioniranje) s ciljem traženja korisnih informacija o sastavu stijenki stanica bobica, kao i s ciljem praćenja promjena polimernoga kompozita tijekom razvoja ploda (na primjer, dozrijevanja).

Sa stanovišta ekonomičnosti i proizvodne perspektive, mijenjanje prirode (razgradnja) strukture stijenki bobica tijekom maceracije i bistrenja, proučavane su indirektnim metodama, praćenjem parametara poput sadržaja tanina i otpuštenih antocijanina.

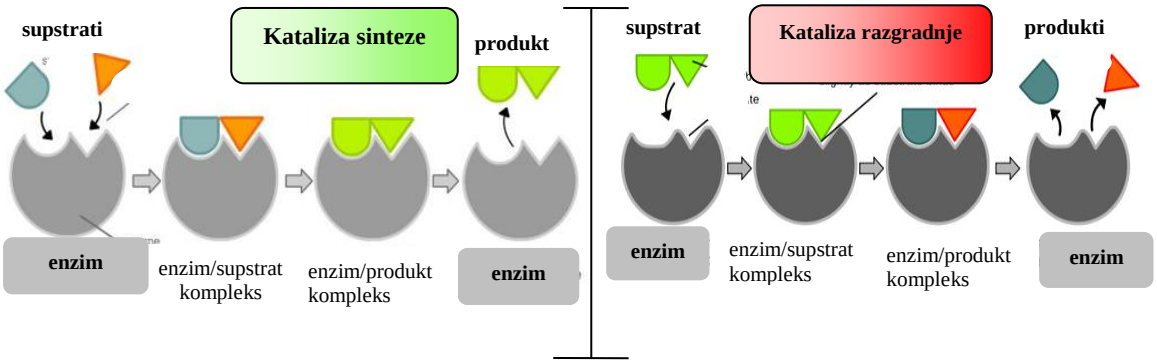
Novije analitičke metode (imunocitologija i imunoafinitetna kromatografija na epitope komponenti staničnih stijenki) pomalo pomiču spoznajne granice o strukturi stanične stijenke, populaciji glukana i prirodi njihove međusobne povezanosti.

3. Primjena enzima u vinarstvu

Početak i ubrzani tijek biokemijskih reakcija reguliraju posebno strukturirani molekularni sklopovi, enzimi. Enzimi su visoko specijalizirani proteini, katalitički aktivni polimeri aminokiselina vrlo kompleksne strukture. Da bi bilo koji biokemijski proces započeo potrebno je u njega uložiti takozvanu aktivacijsku energiju. Aktivacijska energija je energetska barijera kemijskih reakcija. Za prijelaz jednog polaznog spoja – reaktanta u novi spoj – produkt mora se povećati energetski sadržaj polaznog reaktanta, kako bi se dostigla energija takozvanog tranzicijskog stanja. Prijelazno – tranzicijsko stanje je prolazni molekularni trenutak, u kojem su prisutne specije dosegle posebni energetski potencijal, nakon kojeg je raspad supstrata ili produkta jednako vjerojatan događaj. Proces u tom momentu može završiti bilo kidanjem veza bilo formiranjem novih veza. Spontani, direktni prijelaz iz jedne forme biokemijskog spoja u drugu, bez prelaženja tranzicijskog stanja, odnosno bez ulaganja u aktivacijsku energiju nije ostvariv. Enzimi snižavaju aktivacijsku energiju reakcije i posljedično znatno ubrzavaju reakcijski tijek, reakcije su brže od 10^5 do 10^{17} puta (postaju stotisuća do milijun milijardi puta brže). Spoj koji se podvrgava katalitičkom djelovanju enzima, supstrat (reaktant) se prvotno veže na posebno aktivno središte enzima i nastaje enzim-supstrat kompleks. U slijednom koraku dolazi do reakcije u kojoj nastaje novi spoj-produkt koji je i nadalje vezan s enzimom u enzim-produkt kompleks. Potom dolazi do odvajanja produkta i enzima. Prikaz 3.1. grafička je ilustracija katalitičkog djelovanja enzima, uključujući tijek procesa i nastajanje međufaznih kompleksa. Nastajanjem produkta i vračanjem enzima u prvotno nepromijenjeno stanje završava katalitički proces.

Proces se može opisati i relacijom: **E + S ↔ ES ↔ EP ↔ E +P**

(E-enzim, S-supstrat, P-produkt, ES i EP kompleksi enzima sa supstratom ili produktom)

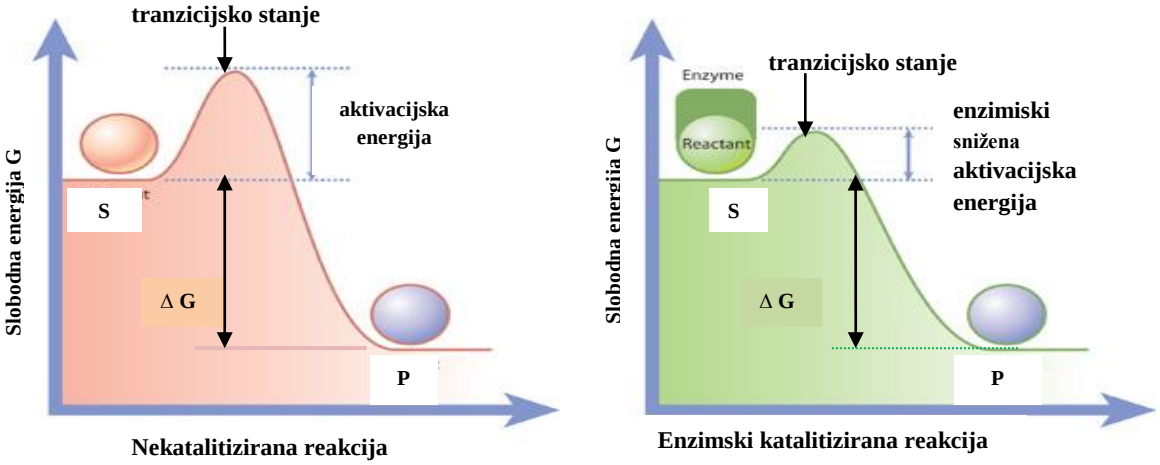


Prikaz 3.1. Opis faza katalitičkog djelovanja enzima, kataliza sinteze i kataliza razgradnje. Preuzeto iz: https://alevelbiology.co.uk/notes/biological-catalysts-enzymes.

Energija se u biološkim sustavima opisuje takozvanom slobodnom energijom sustava. U slučaju da je slobodna energija produkta niža od slobodne energije supstrata tijek reakcije favorizira prijelaz supstrata u produkt, stabilniju formu spoja niže energije. Enzimi ne utječu na smjer reakcije, supstrat→produkt.

Obzirom da je potrebno uložiti energiju da bi neki proces započeo, preskočio aktivacijsku barijeru, uloga enzima u ubrzanju reakcije proizlazi iz njihove sposobnosti da potrebnu aktivacijsku energiju znatno snižavaju.

Prikaz 3.2. opisuje razliku u aktivacijskoj energiji ako se reakcija događa bez i u prisutnosti enzima. Razlika u slobodnoj energiji ΔG supstrata (S) i produkta (P) je slobodna energija koja se oslobađa tijekom procesa. Slovom G se označava takozvana Gibbsova slobodna energija (Gibbsova energija, Gibbsov potencijal), fizikalna veličina koja opisuje oslobođenu ili apsorbiranu energiju u nekom reverzibilnom procesu koji se odvija pri stalnoj temperaturi *T* i tlaku *p*. Obzirom da produkt ima nižu slobodnu energiju preferiran je smjer reakcije od rektanta prema produktu. Razlika ΔG u slučaju nekatalizirane i katalizirane reakcije je ista jer je ona samo indikator smjera procesa prema stabilnijem stanju niže slobodne energije. Ono što razlikuje ova dva mehanizma je katalitičko djelovanje koje snižavanjem aktivacijske energije proces znatno ubrzava ne mijenjajući njegov smjer.



Prikaz 3.2. Aktivacijske energije nekatalizirane i katalizirane reakcije.

Preuzeto iz O'Connor i Adams (2014).

Energija aktivacije je potrebna za pregrupiranje reaktivnih grupa, formiranje tranzicijskog stanja, pregradnju veza između pojedinih dijelova reaktanata ili strukturnu molekularnu transformaciju. Veća aktivacijska energija korespondira sa sporijom reakcijom. Aktivacijska energija se snižava specifično usmjerenim katalitičkim enzimskim djelovanjem, ali i povišenjem temperature.

Procesi koji prate nastajanje vina su rezultat niza biokemijskih transformacija koje kontroliraju i ubrzavaju prisutni enzimi. Pod određenim fizičko kemijskim uvjetima (temperatura, kiselost) i u dovoljno visokim koncentracijama, enzimi aktiviraju (u grožđu i vinu) i kontroliraju biokemijske reakcije i pri tome ubrzavaju pretvorbu jedne vrste kemijskog spoja u drugu ili u više njih. Svaka vrsta enzima uvijek sudjeluje samo u jednovrsnoj kemijskoj reakciji (npr. hidrolizi–hidrolaze, dekarboksilaciji–dekarboksilaze ili oksidaciji–oksidaze) nekog specifičnog spoja ili samo nekog posebnog dijela njegove gradbene strukture.

Mnogi enzimi nastaju prirodnim putem u samom grožđu. Kako izvorno u grožđu nastali enzimi, kao i enzimi koje produciraju kvasci i drugi mikroorganizmi razviti na bobicama, nisu često prisutni u dostatnim količinama i nisu dovoljno efikasni, u intenzivnom vinarstvu, njihovo se djelovanje nadopunjuje komercijalnim preparatima. Brojni komercijalni enzimski preparati se sve više i sve češće danas koriste u vinarstvu.

3.1. Enzimi koji pospješuju prinos, bistrenje i filtrabilnost mošta

Razgradnja staničnih struktura bobice grožđa pod djelovanjem enzima, u fazi muljanja grožđa, otvara put do unutarnjih sadržaja bobice grožđa, pulpe i kožice te se time pospješuje i omogućuje ekstrakcija supstanci koje su inače teško dostupne.

Zbog niže viskoznosti, razgradnjom velikih polimernih kompleksa u manje, kraće oligomerne molekule i monomere, postiže se brže bistrenje mošta. U bobicama grožđa prisutni gradbeni polimeri, celuloze, hemiceluloze i teško razgradivi pektini, primarni su cilj enzimske razgradnje. Pektini i celuloza su dominantni polimeri koji sudjeluju u formiranju kožice (kutikule i epiderme), omogućujući gradbenu stabilnost njihovih staničnih struktura. Pektinolički enzimi ubrzano razgrađuju pektine i time narušavaju strukturu stijenke stanica bobica. Otpuštanjem sokova iz stanica bobice povećava se tekuća frakcija masulja, povećava se volumen samotoka, a dodatno se ubrzava ekstrakciju sastojaka bobica (šećera, kiselina i dr.). Ovi enzimi također potpomažu otpuštanje iz kožice i pulpe spojeva koji doprinose aromatičnosti i boji vina. Dodavanje komercijalnih enzima pektinaza (esteraza, liaza, poligalkturonaza) koji u manjoj mjeri mogu sadržavati i celulaze (glukonaze) i hemicelulaze (ksilanaze) u svrhu povećanja efikasnosti prešanja i dobivanja većih prinosa mošta i poboljšanja bistrenja sve je uobičajenija praksa u vinarstvu. Za bistrenja vina koriste se preparati koji ne sadrže pektinolitičke enzime.

3.2. Maceracija, polifenoli i maceracijski enzimi

3.2.1. Maceracija je tehnološki proces prilikom kojeg dolazi do namakanja i omekšavanja, mehanički razgrađenih i zdrobljenih tkiva bobice grožđa u tekućoj (samotočnoj) frakciji mošta i otpuštanja unutarnjih staničnih sastojaka bobice. Muljanjem se iz mehanički oštećenih stanica tkiva bobice oslobađaju sokovi koji sadrže niz u grožđu sintetiziranih/apsorbiranih klasa spojeva: ugljikohidrata (šećera–glukoze, fruktoze), organskih kiselina (vinske, jabučne, limunske), kationa više elemenata (kalija, magnezija, kalcija, natrija, željeza itd.), proteina (aminokiselina), fenolnih spojeva (antocijanina, tanina), aromatskih spojeva i vode.

Stanice tkiva koje nisu bile mehanički oštećene, u slijednim fazama maceracije, zbog razlike u osmotskim tlakovima, počinju otpuštati unutar stanične komponente. U soku su koncentracije većine spojeva niže nego u stanicama te zbog toga dolazi do osmoze, prijelaza spojeva iz koncentriranijeg medija (stanice bobice) kroz stijenke i membrane u manje koncentrirani vodeni medij – sok. Do slabljenja stijenki stanica dolazi i zbog djelovanja enzima, koji razaraju gradbene polimere stijenki, uništavajući time ono što je do tada štitilo cjelovitost stanica i dostupnost njenom sadržaju.

S motrišta uspješne vinifikacije ključno je maceracijom postići što uspješnije otpuštanje svih spojeva, ali posebice oslobađanje spojeva koji kasnije formiraju aromatski profil i boju vina.
U formiranju ukupnog osjetilnog dojma vina, aromatskog profila i obojenosti vina veliku ulogu imaju polifenolni spojevi, prvenstveno tanini i antocijanini. Neki polifenoli sintetizirani u grožđu tijekom maceracije prelaze u samotok iz kožice bobice, a u manjoj mjeri i iz sjemenki. Dio ove klase spojeva naknadno podliježe molekularnim transformacijama, dio se veže na druge spojeve (npr. polisaharide).

Maceracijom se oslobađaju i hlapljivi spojevi koji su nositelji aroma, ali i predšasnici (prekursori) aroma, koji mogu u post fermentacijskim fazama vinifikacije poprimiti hlapljive forme.
Proces maceracije počinje odmah nakon mehaničke destrukcije cjelovitosti grozda i njenih bobica. Stoga se ponajprije može govoriti o pred fermentacijskoj maceraciji, ali ako se za neka vina objedinjuje u jedan korak maceracija i fermentacija tada možemo govoriti o fermentacijskoj maceraciji.

Predfermentacijska maceracija traje kratko, nekoliko sati, a ako se provodi pri temperaturama nižim od 10 ºC (hladna maceracija), ili se sumporenjem inhibira početak fermentacije, maceracija se može produžiti na nekoliko dana. Odgoda početka prešanja također produljuje ovakav proces maceracije. Takvi produljeni oblici maceracije se koriste pri vinifikaciji bijelih i roze vina.

Fermentacijska maceracija također počinje odmah po operaciji muljanja, kada je masulj u dodiru samo s moštom. Kako, zbog prirodno prisutnih ili inokuliranih komercijalnih kvasaca počinje fermentacija i postepeno formiranje alkohola i ugljičnog dioksida, to maceracija poprima drugačiji smjer. U čistom moštu dolazi do otapanja vodotopljivih spojeva, a u smjesi vode i alkohola u tekuću fazu počinju prelaziti i spojevi topljivi u alkoholu.
Takva maceracija završava nakon što završi i alkoholna fermentacija, a to ovisno o temperaturi obično traje od 4 do 8 dana. Ova vrsta procesa se preferira pri vinifikaciji crnih sorti, rjeđe kod bijelih sorti.

Produljena maceracija, takozvana postfermentacijska maceracija, se odvija ako nakon završene fermentacije zaostali dio masulja ostaje neko vrijeme u kontaktu s provrelim moštom, mladim vinom. Novo nastali medij tvore: alkoholi, ugljični dioksid, voda, malo ili nimalo šećera i djelomično razgrađeni strukturni stanični polimeri.
Obzirom da je fermentacija već završena u mediju je prisutna i velika količina aktivnih ili odumrlih stanica kvasaca. Ti kvasci se počinju razgrađivati, dolazi do procesa autolize.
Nastali produkti autolize kvasaca, proteini, manoproteini i dr., također postaju sastavni dio postfermentacijskog medija, mladog vina. Produljena fermentacijska maceracija traje do podvrgavanja zaostalog masulja procesu prešanja. Obično se takav postupak primjenjuje kod nekih tradicionalnih vinarskih tehnika, a trajanje tog procesa je od 8 dana do 4 tjedna, pri temperaturama od 15 do 35 ºC.

Tijekom maceracije s gledišta vinarstva jedan od važnijih procesa je oslobađanje polifenolnih spojeva. Sjemenke bobica sadrže 60–65 % u grožđu prisutnih polifenola, kožica oko 20–30 %, a u pulpi ih ima samo oko 5–10 %. Polifenoli je naziv koji podrazumijeva čitav niz klasa i pojedinačnih spojeva, prisutnih u grožđu, koji maceracijom prelaze u mošt i vino, a ponekad se međusobno povezuju ili se vežu na druge sastojke vina.

3.2.2. Polifenoli su prirodni spojevi koji u svom sastavu sadrže jedan ili više aromatskih, benzenskih prstenova na koje je vezana jedna ili više hidroksilnih grupa. U vinu su odgovorni za mnoge osjetilne značajke: izgled, boju, trpkost, gorčinu i ukupni oralni osjetilni dojam, ali i stabilnost. Prema kemijskoj strukturi polifenoli su vrlo različiti spojevi, od jednostavnih fenolnih kiselina do visoko polimeriziranih formi poput hidrolizirajućih i kondenziranih tanina.
Fenoli mogu biti vezani na šećere, bilo preko hidroksilnih skupina, bilo direktnim vezanjem šećera na ugljikov atom aromatskog prstena. Veliku porodicu fenolnih spojeva obično kategoriziramo na dvije osnovne grupe, flavonoide i neflavonoide.
U crnim vinima prevladavaju flavanoidi: antocijanini, proantocijanidini (tanini), flavan-3-oli i flavonoli (glikozidi). U bijelim vinima su više prisutni neflavanoidi: hidroksicimetne kiseline i hidroksibenzojeve kiseline.

Flavonoidi
Flavonoidi imaju cikličku strukturu, temeljno se sastoje od dva benzenska prstena (C6) premoštena C3 lancem cikliziranim s kisikom. Na osnovni skelet flavonoida vezano je više različitih radikala i hidroksilnih grupa. Flavonoidi zbog takve svoje strukture imaju antioksidacijska svojstva i sposobnost redukcije opasnih spojeva: slobodnih kisikovih radikala ili helatnih kompleksa metala (Cu i Zn). U ovu porodicu fenola pripadaju: tanini (kondenzirani i hidrolizirajući), antocijanidini, flavanoli, flavonoli, flavanoni, flavoni i kalkoni.

Tanini, su spojevi koji znatno utječu na okusne značajke vina (gorčinu, trpkost i oporost), a mogu se pojaviti kao polimeri flavonoidnih, ali i neflavonoidnih fenola.

Kondenzirani tanini su rezultat reakcije kondenzacije flavanola (flavan-3-ola) i u svojoj strukturi ne sadrže šećere. U grožđu i vinu je najprisutniji kondenzirani tanin epikatehin. Nešto manje je prisutan katehin. B-tipovi proantocijanidina , posebice dimeri (B1, B2 i B3) ili trimerni procijanidin (C1) su pretežito locirani u kožici i sjemenkama bobice. Sadržaj ovih tanina se povećava tijekom starenja vina, povećavajući trpkost. Kondenzirani tanini su uglavnom topljivi u vodi, a neki i u alkoholima. Visokomolekularni tanini su slabo topljivi ili netopljivi u vodi.

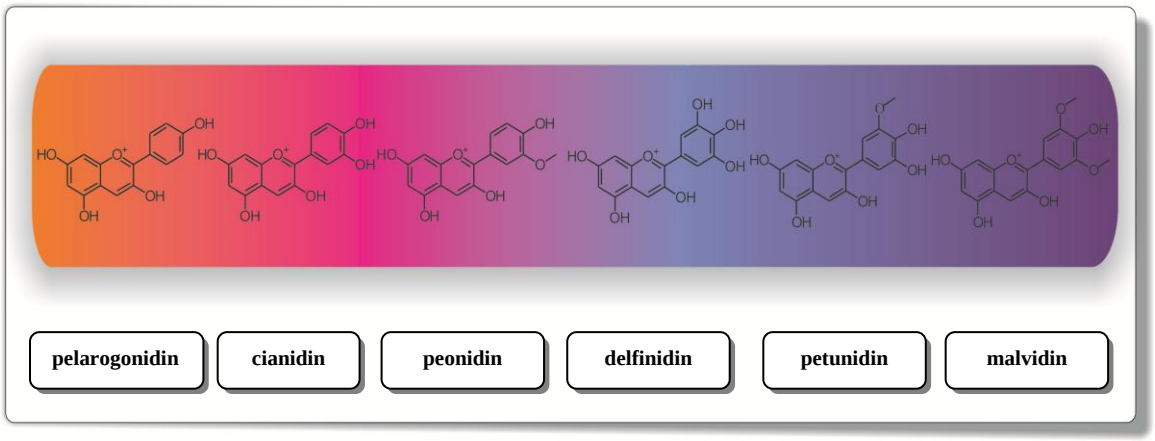
Hidrolizirajući tanini (tanini koji podliježu hidrolizi) su visoko molekularni spojevi, sastavljeni uglavnom od estera galne kiseline (galotanini) ili elagne kiseline (elagotanini) vezanih na glukozu ili druge šećere. Ova klasa tanina je puno podložnija hidrolizi (reakcijom nastaju ugljikohidrati i fenolna kiselina) koju inducira promjena pH ili enzimi.

Ovih tanina nema u *Vitis vinifera* sortama loze, a u vino prelaze iz drva, tijekom starenja vina u drvenim bačvama.
Pri kraju vinifikacije, u fazi dozrijevanja vina, spajanjem tanina iz grožđa i tanina iz drva nastaju nove klase tanina kompleksne strukture.

Tanini tijekom ispijanja vina u ustima izazivaju osjet gorčine, trpkoće i percepciju hrapavosti i sušenja. Ovi spojevi mogu reagirati s proteinima (bjelančevinama) prisutnim u slini i time umanjiti osjet trpkosti. Stoga se pri sljubljivanju vina i hrane često kombiniraju vina bogata taninima (crvena vina) s hranom bogatom bjelančevinama (crveno meso).

Antocijanini i antocijanidini su dva tipa flavanoida koji voću i cvijeću daju boju. Antocijanini, locirani u vakuolama biljnih stanica, su vodotopljivi pigmenti tj. fenoli na koje su vezani monosaharidi, a antocijanidini su antipodi antocijanina, aglikoni – spojevi koji nastaju kada se iz glukozidne forme antocijanina hidrolizom uklone glukozidi.

Antocijanini su pigmenti (bojila) koji se pojavljuju u vanjskim slojevima biljnih struktura, cvijeta i ploda, u rasponu nijansi od crvene do ljubičaste i plave. Boja antocijanina ovisi o njihovoj strukturi, na koju utječu i monosaharidne komponente kao i acilacija šećera pod djelovanjem organskih kiselina.
U kiselom mediju antocijanini poprimaju crvene nijanse, a pomakom u neutralne i lužnate uvjete postaju sve plaviji.
Na njihovu biosintezu utječu mnogi biotički i abiotički stresni faktori (svjetlo, UV radijacija, oscilacije temperature, fizička oštećenja, osmotski stres, neuravnoteženi biogeni elementi, ozon, štetnici, mikrobi i virusi) koji posljedično mijenjaju njihova koloristička i kemijska svojstva. Antocijaninski pigmenti prisutni u kožici bobica grožđa su po sastavu diglikozidi, monoglukozidi, acilirani monoglukozidi i acilirani diglikozidi peonidina, malvidina, cianidina, petunidina i delfinidina. Prikaz 3.3. pokazuje raspon obojenosti vina koji je posljedica prisutnosti pojedinih antocijanina. Udio ovih spojeva varira ovisno o sorti grožđa i uvjetima rasta loze.



Prikaz 3.3. Raspon boja vina uvjetovan vrstom prisutnog antocijanina.
Preuzeto iz: Ananga et al. (2013).

Promjene boje crnih vina jednim dijelom mogu biti uzrokovane i kiselošću vina jer dolazi do prelaska antocijaninskih pigmenata u ioniziranu formu (flavilijum kation) i pojačavaju se svijetlocrveni tonovi obojenosti. Kationska flavilijum struktura antocijanina je vrlo reaktivna i podložna oksidaciji i hidrolizi, a to rezultira i nestabilnošću boje vina.

Vina kojima je vrijednost pH viša imati će više ljubičastih i plavih nijansi, a pri vrijednostima pH višim od 4 može doći i do gubitka boje. Starenjem vina opada koncentracija antocijanina jer dolazi do njihovog vezivanja s taninima, piruvinskom kiselinom i acetaldehidom. Zbog toga se mijenja boja vina, razvijaju se ciglasto crveni tonovi. Dodatno može doći i do polimerizacije novo nastalih spojeva, koji mogu dostići i koncentracije pri kojima pada njihova topljivost do mjere da se počnu taložiti.

Antocijanini su moćni antioksidansi koji biljku štite od UV zračenja, ali i u farmaceutskim preparacijama iskazuju antikarcinogena, protuupalna i pozitivna kardiovaskularna djelovanja.

A**ntocijanidini**, aglikonska forma antocijanina, temeljno ima istu flavonoidnu strukturu kao i antocijanini, ali bez glukozidnih komponenti. Antocijanidini su po kemijskoj strukturi: 3-hidroksiantocijanidini, 3-deooksiantocijanidini ili O-metilirani antocijanidini. Među monomernim antocijanidnim spojevima dominiraju cijanidini, a česti su i delfinidini i pelargonidini. Ovi spojevi iskazuju obojenost pod kiselim uvjetima, ali postaju bezbojni u lužnatom, baznom mediju. Obje klase spojeva, i antocijanini i antocijanidini su prirodna bojila koja se koriste u prehrambenoj industriji. Antocijanidini su također antioksidansi. Boja antocijanidina se u vinu mijenja ovisno o vrijednosti pH, koncentraciji sumporovog dioksida i prisutnosti kopigmenta. Pri niskim vrijednostima pH (manje od 4) svi antocijanidini su u crvenoj flavinijum kationskoj formi. S porastom pH, prijelazom u neutralno i lužnato, intenzitet obojenosti raste, a boja se mijenja prema ljubičastoj i plavoj nijansi. U bijelim vinima nema ovih spojeva. Ako se antocijanidini povežu s drugim fenolnim spojevima dolazi do takozvanog efekta kopigmentacije, koji stabilizira antocijanidine pa samim time i boju.

Flavanoli (flavan-3-oli) su spojevi koji se u grožđu i vinu pojavljuju u monomernoj formi (katehin i epikatehin) ili polimernoj formi (proantocijanidini – koji se još nazivaju i kondenzirani ili nehidrolizirajući tanini). Najčešći flavan-3-oli koji su nađeni u kožici i sjemenkama grožđa su: (+) katehin, (-) epikatehin, epigalokatehin i epikatehin galat. Flavanoli su odgovorni za stabilizaciju i boje i osjetilnih značajki (trpkoće i gorčine).
U mladim bijelim vinima koncentracija im se kreće od 15 do 25 mg/l, a u mladim crnim vinima od 4 do 120 mg/l. Flavan-3-oli vinu daju oporost, a kako su bezbojni ne utječu na boju vina.

Flavonoli su žuti pigmenti (bojila) nađeni u kožici bobica grožđa. Obično se pojavljuju u glikozidnoj formi, vezani na šećere glukozu ili ramanozu, ali mogu se vezati i na galaktozu, arabinozu, ksilozu ili glukoronsku kiselinu. Falvonoli koji pretežu u grožđu i vinu su: miricetin, kvercetin, laricetin, kemferol, isoramnetin i siringetin. Flavonoli su prisutni i u bijelim i u crnim vinima.

U bijelim je njihov udio vrlo malen kao i njihov utjecaj na boju. U crnim vinima ih ima više, ali je njihova žuta boja maskirana crvenilom antocijanidina. No, flavonoli kroz ulogu kopigmenta igraju važnu ulogu u stabilizaciju mladih vina crvenih sorti.

Neflavonoidi

Neflavonoidi u vino prelaze iz kožice bobice, i pojavljuju se u slobodnoj formi ili vezani na antocijanine i šećere. Mogu sadržavati estere te kao takvi imaju utjecaj na aromatičnost vina. Neflavonoidi tvore široku familiju polifenola, pretežito jednostavnije strukture, u odnosu na flavonoide. U ovoj grupi dominiraju stilbeni i fenolne kiseline (hidroksibenzojeva i hidroksicimetna).

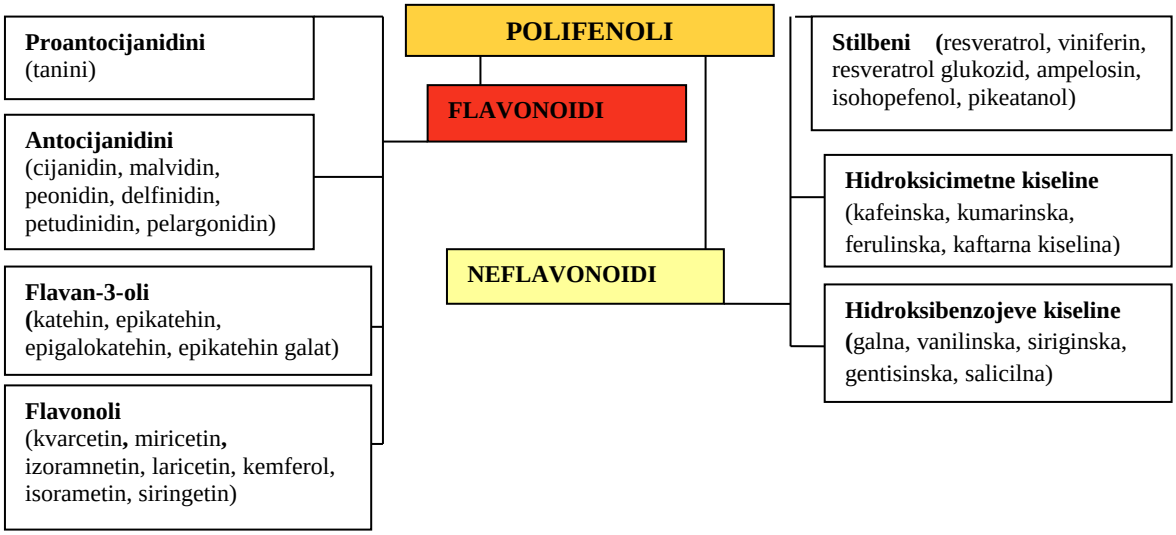
Stilbeni, su bioaktivni spojevi, po kemijskom određenju derivati cimetne kiseline.
Trans-resveratrol i glikozid trans-resveratrola (trans pikeid) su dominanti stilbeni u vinima priređenim iz *Vitis vinifera* sorti.
Prisutne mogu biti i dimerne i trimerne forme ovog glikozida: viniferini (έ-dimer, δ-dehidrodimer, α-trimer), palidol, ampelosin A, mijabenol C, pikeatanol i isohopeafenol.
U grožđu nastaju kao spojevi koji su rezultat obrambenih reakcija loze na vanjske stresne podražaje. U bijelim sortama najprisutniji je glikozid trans-resveratrola, a u crnim hopeafenol. Tijekom vinifikacije ti spojevi prelaze u vino.
Koncentracija resveratrola, najznačajnijeg stilbena, je u grožđu vrlo mala, a u vinu može biti još manja, ako se veže na druge spojeve. Oslobađanje tog spoja pomoću enzima iz kompleksnih glikozidnih struktura postaje jedan od prioriteta razvoja novih klasa enzima. Iako je prisutnost tog spoja vrlo mala, njegov značaj je bitno veći jer ima: antioksidacijski, antitumorni, neuroprotektivni i antimutageni potencijal.

Hidroksibenzojeve kiseline, su derivati benzojeve kiseline. Najprisutnije su: p-hidroksibenzojeva, galna, vanilinska, gentisinska, siringinska i salicilna kiselina. Galna kiselina je od posebne važnosti jer je predšasnik svih tanina koji nastaju hidrolizom.

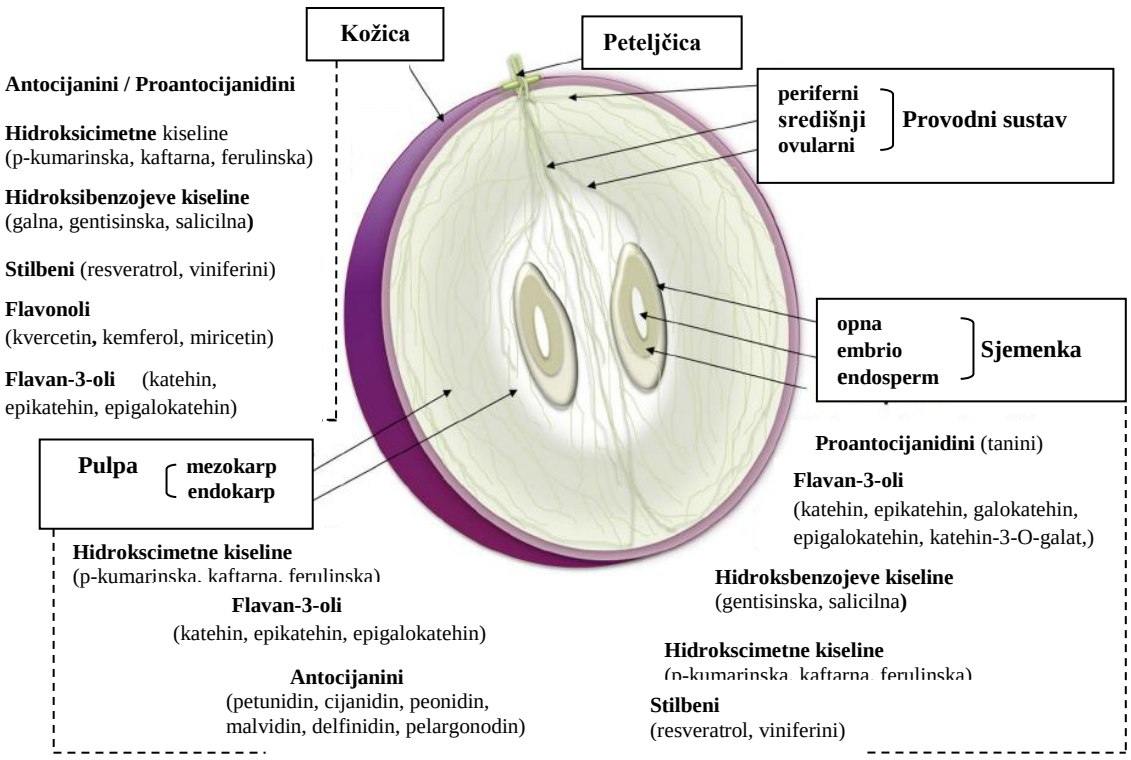
Hidroksicimetne kiseline, su po kemijskom određenju fenilpropanoidi, i treća su grupa fenolnih spojeva po zastupljenosti u grožđu, a dominantna u moštu i vinu. U vinima se pojavljuju u formi estera ili diestera vezanih na vinsku i jabučnu kiselinu. Glavni predstavnici hidroksicimetne kiseline su kafeinska, kumarinska, sinapinska i ferulinska kiselina. Od esterificiranih oblika, najznačajnija u ovoj grupi spojeva (s oko 50 % udjela) je kaftarna kiselina. U vinu ove kiseline utječu na trpkost, ali u manjoj mjeri od tanina. Derivati hidroksicimetne kiseline su podložni oksidaciji i posljedično su uzrokom oksidacijskom posmeđivanju bijelih vina. Ovi spojevi su predšasnici hlapljivih fenolnih spojeva.

Na Prikazu 3.4. dana je sažeta kategorizacija polifenola prisutnih u vinu.

Prikaz 3.4. Kategorizacija polifenola prisutnih u vinu.



Vinova loza tijekom razvoja ploda producira znatnu količinu fenolnih spojeva. U bobici grožđa ti spojevi nisu ravnomjerno raspoređeni. U pulpi pretežu fenolne kiseline, antocijanini i stilbeni se formiraju u kožici bobice, a proantocijanidini (tanini) i flavanoli su locirani u kožici i sjemenkama. Prikaz 3.5. nešto detaljnije opisuje raspored polifenola u tkivima bobice.



Prikaz 3.5. Shematska struktura zrele bobice grožđa i distribucija fenolnih spojeva.
Preuzeto iz: Teixeira et al. (2013).

U vinu sadržaj fenola ovisi o uvjetima pod kojim je raslo grožđe, o sorti grožđa, a ovisi i o izboru procesa vinifikacije. Crna vina su bogatija fenolima razvijenim u kožici i sjemenkama: antocijaninima, proantocijaninima, stilbenima i flavanolima. U bijelom vinu pretežu fenoli koncentrirani u pulpi: fenolne kiseline i manje koncentracije katehina i stilbena. Tijekom dozrijevanja, odležavanja vina jednostavni se fenoli mogu povezati u složene molekule, u procesima kondenzacije antocijanina s taninima i katehinima. Novo nastali spojevi, uključivo i polimerizirani pigmenti mijenjaju gorčinu, trpkoću i boju vina.

Koncentracija fenola u vinu prvenstveno ovisi o njihovoj prisutnosti u grožđu, ali se izabranim postupkom maceracije dodatno utječe na njihov sadržaj u vinu.

U početku maceracije u medij se najlakše iz kožice ekstrahiraju antocijanini, jer su topivi u vodi. Ovi spojevi su ključni za formiranje obojenosti vina.
Istovremeno s ekstrakcijom antocijanina počinju se iz kožice izlučivati i tanini, ali se njihova ekstrakcija nastavlja puno dulje jer njihovo otapanje potpomaže i novonastali etanol. Koncentracija tanina u grožđu je oko deset puta viša od sadržaja antocijanina.

Tanini su prisutni i u sjemenkama, ali za njihovo oslobađanje je potrebna destrukcija opne sjemenke, odnosno otapanje njenih gradbenih lipida, u prisutnosti etanola. Sjemenke bobica su vrlo bogate polifenolima, ali pretežito sadrže monomerne flavan-3-ole i proantocijanidine (tanine).
Ekstrakcija taninski spojeva počinje negdje na pola procesa alkoholne fermentacije, ali se nastavlja i tijekom perioda postfermentacije. Tanini iz kožice su osjetilno prihvatljiviji jer su puno „mekši“ osim ako se ne radi o preradi nedozrelog grožđa.

Postfermentacijska maceracija doprinosi većoj stabilnosti boje, zbog vezivanja antocijanina s taninima u kompleksne polimere, ali i polimerizacijom samih tanina nastaju spojevi koji doprinose bogatijim osjetilnim dojmovima vina, ali i većim potencijalom nastajanja kvalitetnijih vina tijekom starenja vina.

3.2.3. Maceracijski enzimi

Komercijalni enzimski preparati, proizvedeni i pripravljeni za dodavanje u masulj, mošt i vino (predfermentacijska faza) se u ova vremena naširoko koriste u pripravi crnih vina, ali sve više i kod bijelih sorti.
Enzimski preparati koji se dodaju u svrhu brže i bolje maceracije prvenstveno svoju efikasnost temelje na djelovanju pektinolitičkih enzima (galakturonaza, esteraza, liaza), celulaza (glukonaza, ß-glukozidaza) i hemicelulaza (ksilozidaza, ksilanaza). Kako se fermentacija crnih sorti tradicionalno odvija na masulju (smjesi samotoka i mehanički razgrađenih dijelova bobica), maksimalna učinkovitost maceracija postiže se dodavanjem enzima prije početka fermentacije.
Otpuštanje antocijanina iz kožice bobica znatno doprinosi obojenosti, ali i oslobađanju spojeva koji pozitivno djeluju na arome vina. Efikasnost maceracije masulja crnih sorti grožđa predmnijeva korištenje i glukozidaza, i to onih čija djelovanja nisu inhibirana prisutnošću glukoze

3.3. Korištenje enzima u svrhu poboljšanja aroma vina

Sortne arome, sadržane u bobicama grožđa, potječu od prisutnih hlapljivih mirisnih spojeva. Uglavnom su to: monoterpeni, C-13-norizoprenoidi, te derivati benzena i dugo lančanih alifatskih alkohola. U grožđu su uvijek prisutni i bezmirisni nehalapljivi gluko-konjugirani spojevi.

Predšasnici aroma koji su glukozidne kemijske strukture mogu se kemijskim reakcijama pretvoriti u hlapljive mirisne spojeve i doprinijeti povećanju aromatičnosti vina. Glukozidne veze (veze između dvije molekule šećera međusobno povezane kisikom) uglavnom sadrže spojevi koje tvore jednostavni šećeri: glukoza, ramano-arabinoza ili apioza povezanih s predšasnicima mirisnih spojeva, u disaharidne glukozide. Oslobađanje mirisnih spojeva ubrzava se ako se u vino dodaju enzimi (glukozidaze). Procesi ove vrste se obično odvijaju u dva koraka. U prvom stupnju α-ramanozidaze, α-arabinozidaze ili ß-apozidaze oslobađaju terminalno vezani šećer, a u drugom stupnju ß-glukozidaza oslobađa aromatični α-glukon i glukozu. Ispitivanjima je pokazano da glikozidni predšasnici aroma ostaju uglavnom nepromijenjeni tijekom procesa vinifikacije jer je efikasnost glukozidaza prirodno prisutnih u grožđu i kvascima *S. cerevisiae* vrlo slaba.

U traženju korisnih vrsta glukozidaza koje bi ubrzale i obogatile aromatičnost vina ispitivano je više vrsta glukozidaza dobivenih iz posebno selektiranih kvasaca, gljivica i bakterija. Trenutno kao vrlo efikasne vrste glukozidaza su se pokazale one dobivene iz sojeva *Aspergillus niger* gljivica. Neki gljivični enzimi su aktivni i pod uvjetima koji vladaju tijekom alkoholne fermentacije.
No, pokazano je da glukoza (dominantno prisutan šećer u grožđu) u većini slučajeva inhibira, blokira djelovanje glukozidaze. Ta činjenica vodi do toga da je ta vrsta enzima efikasnija ako je dodana tek po završetku alkoholne fermentacije, odnosno najbolje nakon što je glukoza gotovo sva metabolički pretvorena u alkohol.

3.4. Uloga enzima u fazi dozrijevanja i starenja vina

Nakon završetka alkoholne fermentacije (postfermentacijska faza) počinje dozrijevanje mladog vina i to već u prisutnosti grubog taloga, a nakon skidanja s grubog taloga slični procesi se nastavljaju i u vinu koje je u dodiru s finim talogom (engl. „aging on lees").

Postfermentacijski talog sadrži pretežito mikroorganizme (kvasce i bakterije), a u manjem obimu i anorganske materijale, npr. tartarate, soli vinske kiseline. Tijekom starenja na talogu, a i tijekom fermentacije dolazi do odumiranja kvasaca i njihove samo razgradnje (autolize), a to ima za posljedicu promjene senzornih i kemijskih značajki vina.

Autoliza struktura kvasaca (jednostaničnih mikroorganizama) uključuje i hidrolizu koja mijenja sastav biopolimera pod djelovanjem hidrolitičkih enzima (ß-glukonaza, ß-glukozidaza, proteaza itd.). Posljedica ovakvih procesa je otpuštanje raznolikih „dobrih" spojeva u vino. Peptidi, aminokiseline, masne kiseline i nukleotidi oslobađaju se iz citoplazme stanice kvasca, a glikani i manoproteini dolaze iz staničnih membrana kvasca.

Ovi spojevi imaju ključni značaj u organoleptičkoj osjetilnoj percepciji i stabilnosti vina. Važni su i u formiranju pjenušaca.

Trajanje vremena starenja na talogu (u vinarstvu preferirano na finom talogu) je varijabilno, izborno ovisno o poželjnim osjetilnim i kvalitativnim značajkama vina.
Premda dulje vrijeme kontakta vina i taloga pozitivno utječe na kvalitetu vina, zbog rizika oksidacije i mikrobne kontaminacije i troškova proizvodnje dobro je taj period skratiti.
U tu svrhu mogu se koristiti komercijalni enzimski preparati koji sadrže ß-glukonaze. Glukonaze mogu katalizirati hidrolizu ß-(1-3) i ß-(1-6) glukozidnih veza, u glukanskim lancima koji dominiraju u staničnim stijenkama. Time se postiže progresivna degradacija staničnih stijenki i ubrzava razgradnja mnoštva odumrlih kvasaca.

3.5. Enzimi prirodno prisutni u grožđu

Enzimi prisutni u grožđu (nastali u bobici ili prenijeti od strane mikroorganizama u bobicu) prvenstveno sudjeluju u razgradnji gradbenih elemenata bobica, ali važnost imaju i u procesima pretvorbe grožđa u vino (alkoholna fermentacija, jabučno/mliječno vrenje). Bobice grožđa sadrže više enzima: protopektinaze (koje pokreću degradaciju netopljivih protopektina i posljedično nastajnje vodotopljivih pektina), glukozidaze, proteaze, tirozinaze i dva od tri enološki najvažnija pektinolitička enzima: pektin metilesterazu (PME) i endopoligalakturonazu (endo-PG). No, u grožđu nisu nađene galaktonaze, celulolaze i ksilanaze.

Pektin metilesteraza (PME) nastaje prvenstveno u kožici bobica grožđa. Ovaj enzim je u ostalim dijelovima bobice prisutan u puno manjim koncentracijama, dva do tri puta manje u mesu bobice, a u sjemenkama ga gotovo nema. Prisutnost PME varira po sortama grožđa, a povećava se kako grožđe dozrijeva.
Poligalakturonaza (PG) pospješuje fiziološko dozrijevanje staničnih stijenki bobica. Djelovanje ovog enzima usmjereno je na hidrolizu molekula koje su nastale pod djelovanjem PME. Efikasnost djelovanja ovih enzima u bobicama opada u zadnjim fazama dozrijevanja grožđa, a jako je slabo njihovo djelovanje pod uvjetima vinifikacije (alkohol, pH, temperatura).
Glukozidaze. U grožđu je osim aktivnosti pektinolitičkih enzima registrirana i aktivnost enzima iz klase glukozidaza, od kojih je od najvećeg značaja aktivnost ß-D-glukozidaze, ali je zamijećena i prisutnost ß-L-arabinofuranozidaze i ß-L-ramanozidaze. Sinteza ovih enzima korespondira s dozrijevanjem grožđa. No, uočeno je da je djelovanje ß-D-glukozidaze u moštu inhibirano zbog prisutnosti glukoze.

Pored ostalog, ispitivanjima su u grožđu registrirane prisutnosti: protopektinaza (koje produciraju vodotopljive i visoko polimerizirane pektine iz protopektina), proteaza, ß-galaktozidaza, ali nisu pronađeni galaktonaze, celulolaze i ksilanaze.

Prirodno u grožđu nastali enzimi imaju slabu toleranciju na niske temperature i pH mošta (2,3 do 3,8), a često ih inhibira i prisutna glukoza, SO_2, tanini iz crnog vina i alkohol.

3.6. Enzimi koje stvaraju kvasci i drugi mikroorganizmi

U vinarstvu dominanti kvasci *Saccharomyces cerevisiae* produciraju nekoliko vrsta enzima: ß-glukozidaze, ß-glukanaze, proteaze (kisele endoproteaze A), a neki sojevi produciraju i male količine pektinaza. Uglavnom su nastale ß-glukozidaze inhibirane u prisutnosti glukoze, ali nađeni su sojevi *Saccharomyces c*. koji stvaraju ß-glukozidaze čije djelovanje ne inhibira prisutnost glukoze. Procese autolize kvasaca ubrzavaju prisutne ß-glukanaze i kisele endoproteaze. Neki kvasci razgrađuju pektine pod djelovanjem pektinaza koje sami stvaraju, ali takvo djelovanje inhibira glukoza ako je prisutna u koncentraciji višoj od 2 %. Vrste kvasaca koji nisu istovrsni *S. Cerevisiae*, a stvaraju za vinifikaciju korisne enzime pripadaju na alkohol tolerantnim sojevima gljivica *Hanseniaspora, Kloeckera i Candida.*. Ovi kvasci izlučuju u periplazmatski prostor i u okolni medij enzime glukozidaze, celulaze, esteraze i td. Za razliku od prirodno na grožđu dominantno prisutnih vinskih kvasaca, djelovanje enzima koje ovi navedeni kvasci produciraju nisu inhibirani glukozom. Gljivica *Botritis cinerea*, koja se na grožđu pojavljuje kao štetna siva plijesan, producira vrlo aktivne depolimerizirajuće pektinaze (metilesterazu i poligalakturonazu) koje razgrađuju stanične stijenke bobica i time iniciraju nastajanje vrlo opasnih plijesni. Međutim *Botritis c*. producira još niz štetnih enzima: glukozidaze — degradiraju aromatski potencijal vina, lakaze — vrlo aktivno djeluju na fenolne spojeve uzrokujući ozbiljnu oksidaciju i probleme s posmeđivanjem, celulaze (multikomponentni kompleks: celobiohidrolaze (endo i egzoglukanaze) i celobiaze (posebne vrste ß-glukozidaza) — djeluju sinergistički u više stupanjskim procesima razgradnje staničnih stijenki bobica grožđa stvarajući uvjete za formiranje opasnih nepoželjnih plijesni. Korisni enzimi koji se pojavljuju u grožđu ili ih stvaraju neki sojevi posebnih kvasaca nisu obično prisutni u dovoljnim količinama ili nisu dostatno aktivni pod uvjetima vinifikacije. Zbog povećanja efikasnosti, većina vinifikacijskih enzima koji se koriste u današnje vrijeme izabrani su po kriteriju povećane otpornosti na uvjete koji vladaju u vinu. Proizvode i primjenjuju se u formi koncentrata, industrijskih komercijalnih preparata. Preparati su formulacije koje sadrže kombinacije različitih enzima i proizvode se u više oblika. Ishodišni materijali ovih preparata su i nadalje u prirodi prisutni mikroorganizmi, sojevi nekih gljivice (*Aspergillus* i *Trichoderma*).

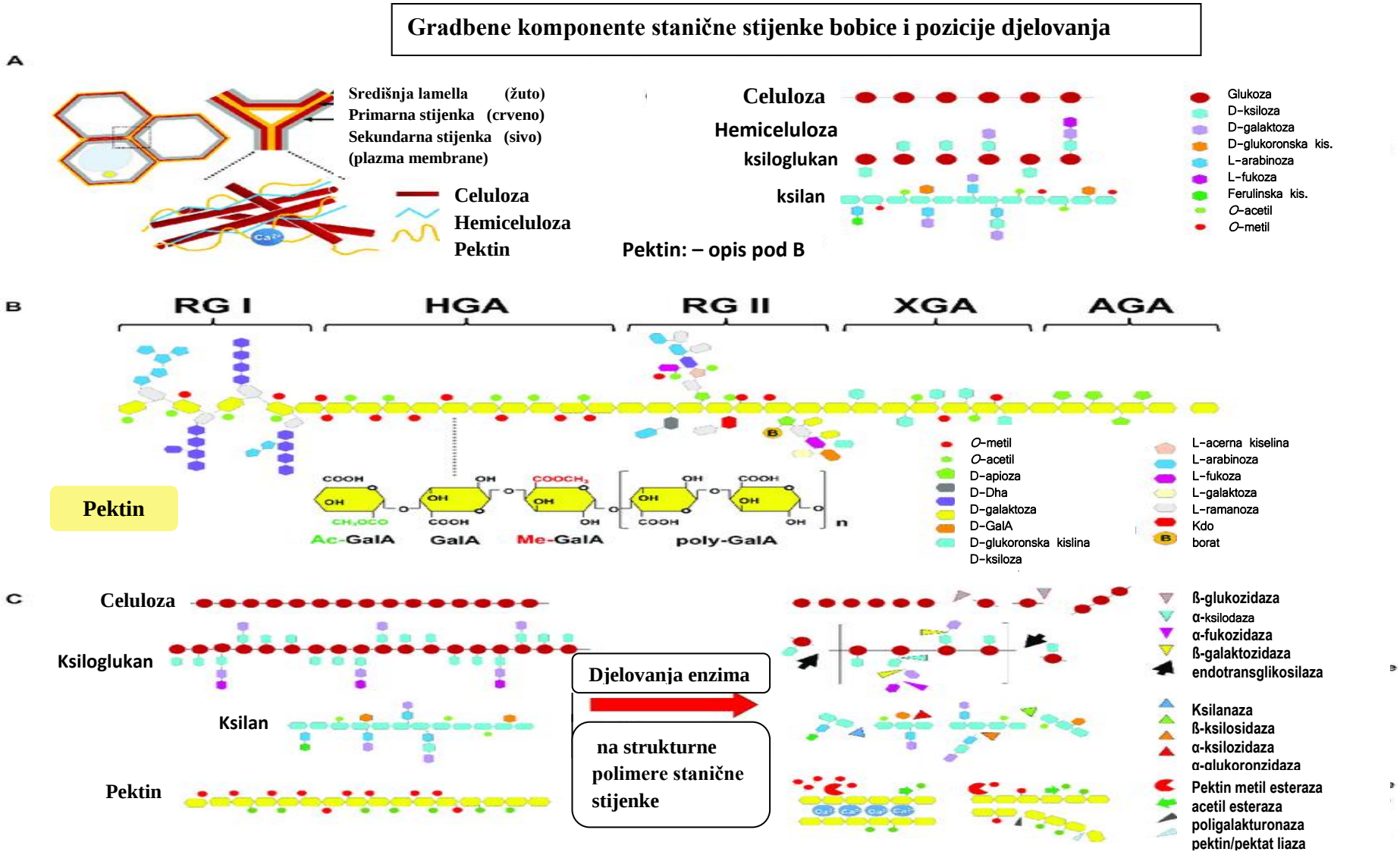
3.7. Djelovanje enzima na gradbene polimere stanične stijenke

U vinifikaciji, jedan od važnijih ciljeva i potreba je razumjeti molekularnu strukturu staničnih tkiva bobice i kako i kada na njihove fizičke i kemijske promjene djeluju enzimi. Sve počinje od bobice, njene gradbene strukture, mehaničke destrukcije njenih tkiva, pretvaranja tih tkiva u sokove i djelovanja mikroorganizama na komponente tih sokova.
No pri tome ono što će na kraju biti vino, nastaje kao posljedica prvenstveno biokemijskih promjena molekularne strukture makromolekularnih gradbenih komponenti, svega od čega je bobica izgrađena. Stanične stijenke bobica su primarni cilj razgradnje cjelovitosti bobice grožđa, jer je to nužni preduvjet slijednih procesa vinifikacije.
Heterogena smjesa komponenti stanične stijenke kao i njena debljina mogu jako varirati prvenstveno zbog uvjeta rasta u kojima se bobica formirala. Stanične stijenke su sofisticirana struktura, kompleksna polimerna matrica.

Strukturu stanica, od kojih su izgrađena tkiva bobice, tvore umreženi polimeri više vrsta, a dominiraju: polisaharidima bogati polimeri (celuloza, hemiceluloza, pektini) i proteini. Svi ti polimeri stvaraju fleksibilnu, dinamički promjenjivu trodimenzionalnu višeslojnu mrežno isprepletenu strukturu stanične stijenke. Više slojna struktura je detaljnije opisana u prethodnom tekstu, Poglavlje 2.3., stranice 6. i 7.

U slijednom tekstu shematski je opisana nosiva gradbena struktura stanične stijenke bobice, a detaljnije su opisane molekularne strukture dominantnih gradbenih polimera i promjene koje na njima mogu nastati pod djelovanjem enzima (Prikaz 3.6.).
Višestaničnu unutarnju strukturu tkiva odjeljuju, ali i povezuju, središnje međustanične lamele. Struktura stanične stijenke — primarna stanična stijenka okružuje i zatvara stanicu, ali na način koji omogućuje njen rast, sekundarni sloj stijenke (plazmatska membrana) ima ulogu održanja stanične cjelovitosti, Prikaz 3.6.-A. Strukturu stanične stijenke tvore celulozni i necelulozni neutralni polisaharidi (celuloza, hemiceluloza, ksiloglukan, ksilan) ugrađeni u pektinsku matricu, Prikaz 3.6.-A.
Celuloza je u osnovi jednostavni lanac (bez postraničnih supstituenata) umreženih molekula glukoze. Celuloza se u staničnim stijenkama pojavljuje u formi celuloznih mikrovlakna (Prikaz 2.2., stranica 6.) koje su strukturni elementi primarne stanične stijenke (višestruki lanci ß-glukoze povezani ß-1,4 glukozidnim vezama). Ova su vlakna međusobno premoštena hemicelulozom i pektinom.
Hemiceluloza je polimerna molekula razgranate strukture, koju tvore **ksiloglukan**, polimer koji je izgrađen od ß-1,4 povezanih glukoza na koje su postranično vezani kraći lanci molekula ksilana na pozicijama α-1,6. **Ksilan** je polimer koji se sastoji od osnovnog lanaca ß-1,4 povezanih ksiloza (Xyl), po sastavu pentoznih šećera, na koje su vezani glukoronska kiselina ili arabinoza, a na tu strukturu se mogu supstituirati i acetilne i metilne grupe. Dodatno se na te postranične lance mogu vezati galaktoza ili fukoza, tvoreći pri tome kompleksno grananje. Galaktoza je jednostavni monomolekularni šećer, istog kemijskog sastava kao i glukoza, ali drugačije stereo strukture, tj. stereo izomer glukoze. Ovaj šećer je manje slatkoće od glukoze, grožđanog šećera. Disahrid galaktoze, dvije molekule povezane u jednu, tvore šećer laktozu, mliječni šećer. Fukoza je 6-deoksi-L-galaktoza.
Pektin (Prikaz 3.6.-B) je naziv za kompleksnu klasu polisaharida čija je osnova lanac povezanih molekula galakturonske kiseline (oksidirane forme jednostavnog šećera galaktoze – stereo izomera glukoze). Pektini su locirani u središnjoj međuslojnoj lameli i u primarnoj i sekundarnoj staničnoj stijenci. Pektini su pretežito izgrađeni iz više vrsta galaktana (polisaharida kojeg čine povezane molekule galaktoze): homogalaktana (HGA), ramanogalaktana I (RG-I), ramanogalaktana II (RG-II), ksilogalaktana (XGA) i apiogalaktana (AGA). Ovi galaktani povezuju strukturu stanične stijenke dajući joj istovremenu i elastičnost i čvrstoću, ovisno o kemijskoj modifikaciji.

Specifično ciljano djelovanja enzima na strukturne polimere stanične stijenke dano je na Prikazu 3.6.-C. Shematski su naznačene pozicije na kojima se očekuje djelovanje enzima na pojedine polimere staničnih stijenki i vrste enzima koji razgrađuju strukturne polimere na tim pozicijama.



Prikaz 3.6. Gradbene komponente stanične stijenke bobice i ciljevi djelovanja enzima na *strukturne polimere stanične stijenke.*

Preuzeto iz: Hui-Chen Wu et al. (2018).

4. Klasifikacija enzima po funkcionalnosti

Vrste enzima mogu se klasificirati i po funkcionalnosti, specifično usmjerenoj katalitičkoj razgradnji ključnih strukturnih polimera;
(a) Djelovanju na protopektin — protopektinaze (b) Djelovanju na pektin — pektinaze, (c) Djelovanju na celulozu — celulaze, (d) Djelovanju na hemicelulozu — hemicelulaze i (e) Djelovanju na proteine — proteaze.
U vinarstvu je poznato i djelovanje specifično usmjerenih enzima: (i) Oksidiranje fenola — oksido-reduktaze (tirozinaze), (ii) Oksidacija fenola — lakaze, (iii) Degradacija lipida — lipolitički enzimi i (iv) Pretvaranje jabučne (engl. malic) kiseline u mliječnu (engl. laktic) — malolaktični enzimi.

4. 1. Pektinolitički enzimi – pektinaze

Visoka viskoznost pektinskih lanaca, topljivih u vodenom mediju, nakon muljanja i razbijanja strukture bobica, ometa ekstrakciju mošta, bistrenje i filtriranje. Dodatno, pektini onemogućuju difuziju fenola i aromatskih spojeva u mošt i vino tijekom fermentacije. Za kompletnu razgradnju pektina u manje fragmente potrebno je usklađeno sudjelovanje više vrsta enzima. Protopektinaze hidroliziraju u vodi netopljive protopektine (prisutne u nedozrelom voću) i prevode ih u topljive pektine koji su podložni enzimskoj razgradnji pod djelovanjem pektinolitičkih enzima. Pektinaze su grupa enzima koja katalizira razgradnju pektina, bilo deesterifikacijom (esteraze) bilo depolarizacijom (hidrolaze, liaze). Vinifikacijske esteraze se razvrstavaju u dvije kategorije: pektin metilesteraze (PME) i pektin acetil esteraze (PAE). Depolimeraze djeluju na razgradnju pektina, ali i poligalaturonske kiseline i ramanogalakturonana. Depolimeraze koje hidroliziraju pektin kategoriziramo kao: polimetilgalakturonaze (PMG) i pektin liaze (PL). Depolimeraze koje hidroliziraju poligalakturonsku kiselinu kategoriziramo kao poligalakturonaze (PG). Pektat liaze (PGL) uzrokuju transeliminaciju poligalaturonske kiseline. Ramanogalakturonaza (RG) hidrolizira ramanogalakturonan, a ramanogalakturonan liaza (RGL) uzrokuje transeliminaciju ramanogalakturonana. Za vinarstvo su ključna djelovanja pektin metil esteraze (PME), pektin liaze (PL) i poligalakturonaze (PG) pa su te pektinaze često prisutne u komercijalnim preparatima.

Pektin metil esteraza (PME)

Pektin metil esteraza odcjepljuje esterske grupe vezane na poligalakturonsku kiselinu, oslobađajući metanol i pretvarajući pektin u pektat. Ovaj enzim ima visoki afinitet prema djelovanju na metil estere poligalakturonske kiseline. Optimalni uvjeti za njegovo djelovanje su kod pH 3,5 do 4,5 (gljivični enzimi) i pH 7–9 (biljni enzimi) i temperature do 37 ºC. Pektin esteraza drastično ruši viskoznost tekućeg dijela masulja–mošta, znatno olakšavajući tečenje mošta.

Endopektin liaza (PL), specifično djeluje katalizirajući depolimerizaciju visoko esterificiranog pektina, nehidrolitičkim cijepanjem glikozidnih veza, u strukturi lanca poligalakturonske kiseline.

Gljivični enzim endopektin liaza optimalno djeluje pri pH 5 do 5,5. Suprotno od efikasnosti PG, ovaj enzim ima veću aktivnost ako je metiliranost pektina povećana.

Poligalakturonaza (PG)

Poligalakturonaza (homogalakturonan liaza, pektin depolimeraza) je enzim koji katalizira reakcije koje razaraju glikozidne veze u molekuli galakturonske kiseline. Enzim djeluje na nisko metilirane pektine i pektate, a optimalno djeluje pri pH 4-5.

Postoje različite vrste poligalakturonaza, koji su različito usmjerene u svom djelovanju (egzogene i endogene).

–**Egzopoligalakturonaze** djeluju na nereducirajuće završetke pektinskog lanca. Ovom vrstom reakcije nastaju galakturonska kiselina ili digalakturonska kiselina. Ovi enzimi imaju jaki afinitet prema nemetiliranim pektinima, inhibiraju ih ramanoza i postranični lanci. Dobivaju se izoliranjem iz voća i povrća, a optimalno djeluju pri pH 4,5 do 5,5.

–**Endopoligalakturonaze** djeluju na pektin inicirajući nastajanje monomera galakturonske kiseline, njihovih dimera i trimera. Efikasnost ovisi uvelike o stupnju metiliranosti pektina, a ako je metiliranost pektina veća od 75 % ovaj spoj ne može biti hidroliziran samo djelovanjem enzima PG. Uspješnost djelovanja enzima PG predmnijeva prethodno djelovanje PME, koji reducira stupanj metiliranosti.

Većina komercijalnih enzimskih preparata kao izvor koriste gljivice i u osnovi su dobro definirana smjesa enzima. Komercijalno dostupne pektinaze sadrže od 2 do 5 % aktivnih enzima i više dodataka (šećere, anorganske soli, konzervanse) koji stabiliziraju i standardiziraju sastav preparata. Dodavanje enzima u formi više komponentne formulacije ima dodatne prednosti jer istovremeno djeluje u više smjerova. Primjer su komercijalni preparati enzima, koji osim pektinaza sadrže i celulaze i hemicelulaze.

4.2. Celulitički enzimi – celulaze

Celuloza je složeni polisaharid koji je izgrađen od linearno povezanih jedinica D-glukoze. Pripada grupi teško reducirajućih ugljikohidrata. Potpunom hidrolizom celuloze nastaje D-glukoza. Tu reakciju kataliziraju enzimi celulaze.

Celulaza je svaki enzim koji katalizira razgradnju celuloze i povezanih polisaharida.

Razgradnja celuloze je složeni proces u kojem se često koriste sinergijska djelovanja multikomponentnog enzimskog kompleksa: **endo i egzoglukanaza (celobiohidrolaza)** i **ß-glukozidaze** (**celobiaza)**. Sinergijsko djelovanje oslobađa puno više jednostavnih saharida. Razgradnja celuloze je efikasnija uz dodatno djelovanje lignolitičkih polisaharid monooksidaza.

Kategorizacija celulaza temelji se na tri tipa reakcija koje kataliziraju:

• **endocelulaze (endoglukanaze**), nasumično kidaju unutarnje veze (amorfne forme celuloze) i time stvaraju nove završetke lanca celuloze.

• **egzocelulaze (egzoglukanaze/celobiohidrolaze**), otkidaju na krajevima lanca, nastalih pod djelovanjem endocelulaza, dvije do četiri monomerne jedinice celuloze i time stvaraju disaharide do tetrasaharide.

• **beta-glukozidaze (celobiaze**), hidroliziraju produkte nastale pod djelovanjem egzocelulaza uz nastajanje monosaharida.

Celulaze u procesu vinifikacije poboljšavaju maceraciju masulja i ekstrakciju i bistrenje mošta. Celulaze potpomažu i prešanje, povećavajući prinos preševine.

Za potrebe proizvodnje celulaza u formi komercijalnih preparata kao ishodišni mikroorganizmi koriste se gljivice *Aspergillus niger, A. nidulans* i *A. oryzae.*

4.3. Glikozidaze, glukozidaze

Glikozidaze (nazvane i glikozidhidrolaze ili glikozilhidrolaze ili celobioze) su enzimi koji kataliziraju hidrolizu glikozidnih veza u kompleksnim šećerima, glikanima. Glikani su polisaharidni spojevi koji se sastoje od velikog broja glikozidno povezanih monosaharida. Homoglikani su polimeri koje su izgrađeni od samo jedne vrste monosaharida (glukani – polimeri glukoze, fruktozani – polimeri fruktoze, galaktani – polimeri galaktoze itd.). Heteroglikani imaju u sastavu obično 2 do 4 vrste monosaharida (na primjer amino šećere i uronske kiseline).

Beta-glukozidaze su enzimi koji kataliziraju hidrolizu glikozidne veze u D-glukozidima (glukanima izgrađenim iz D-glukoze, vezanim na ß-pozicijama) ili oligosaharidima. Proces rezultira otpuštanjem glukoze ili disaharida koje enološki kvasci lako apsorbiraju. Djelovanje glukozidaza u moštu i vinu je inhibirano glukozom pa je zbog toga njihova djelotvornost blokirana sve do završetka fermentacije. No, postoje i kvasci (za sada u fazi razvoja) koji stvaraju glukozidaze koje nisu osjetljive na glukozu.

Enzimima (ß-glukozidazama) inicirana hidroliza kompleksnih, šećerima konjugiranih predšasnika aroma, rezultira otpuštanjem vrlo aromatičnih hlapljivih aglikonskih formi mirisnih spojeva, posebice terpena.
Organoleptičke osjetilne značajke vina određuju različiti spojevi koji su prisutni već u samome grožđu (arome) ili se pojavljuju tijekom fermentacije i dozrijevanja vina (bouquet). Mirisne i ukupne oralne osjetilne dojmove određuju spojevi poput estera, alkohola, tiola i terpena (linalol, nerol, geraniol).
Većina aktivnih aromatičnih spojeva (C13-norizoprenoidi, derivati benzena, alifatski alkoholi, fenoli) nastaju kao sekundarni metaboliti, pretežito u kožici bobice grožđa. Oko 90 % ovih spojeva se izvorno ne javljaju u slobodnoj formi, već su povezani s mono ili disaharidima u vodotopljive bezmirisne komplekse.

Zbog niskog praga osjetljivosti terpeni posebice utječu na osjetilni dojam. Terpeni su u raznim kompleksima vezani na ramanaza-glukozu, arabinoza-glukozu ili apioza-glukozu. U određenim okolnostima uz prisutne enzime ramanozidaze, arabinozidaze ili apozidaze počinje složeni stupnjeviti proces hidrolize tih kompleksa. Prvo dolazi do odcjepljenja terminalno vezanih šećera. U drugom koraku pod djelovanjem ß-D-glukopiranozidaze dolazi do otpuštanja terpena. To znači da se tek u drugom koraku oslobađaju terpeni, i to oni koji su vezani na samo jednu molekulu glukoze. Međutim danas postoje i glukozidaze koje su u stanju hidrolizirati glikozidne veze u aglikonu samo u jednom koraku, bez obzira kako su na osnovni lanac vezani šećeri.

U otpuštanju hlapljivih aromatičnih spojeva djelovanjem na vezane forme mirisnih spojeva važnu ulogu ima glukozidazni kompleks koji obično sadrži enzime:

α-L-arabinofuranozidazu koja omogućuje kompletnu razgradnju arabinoksilana, arabinana i arabinogalaktana. Ovaj enzim katalizira kidanje internih glukozidnih veza uz nastanak arabinofuranozil-glikozida, predšasnika kompleksnih aroma,
α-L-ramanozidazu koja omogućuje sekvencijsku hidrolizu u ramanosil-glikozidne predšasnike kompleksnih aroma,
ß-D-glukozidaza djeluje na terminalne šećere koji se oslobađaju sekvencijskim djelovanjem α-L-arabinofuranozidaza i α-L-ramanozidaza. Slijedno, hlapljivi spojevi (monoterpenoli, neizoprenoidi i hlapljivi fenoli) bivaju otpušteni iz monoglikozida.

Polifenoli prisutni u crnom vinu, a posebice resveratrol, imaju u ova vremena povećani značaj i sve popularniji interes i od strane konzumenata, ali i vinarske struke. Većina polifenola se u prirodi pojavljuju kao spojevi povezani (konjugirani) sa šećerima ili organskim kiselinama, što ih čini manje dostupnima za čovjeka.
Resveratrol je spoj za koji se vjeruje da ima mnoga korisna bioaktivna djelovanja na ljudski organizam (protuupalna, antitumorska, kardio protektivna, vazo-relaksirajuća, neuro zaštitna).
Količina glikoziliranih formi resveratrola (polidatini) nađena je u crnim vinima u koncentraciji deset puta većoj, nego u drugim pićima. Kako su modificirane (konjugirane) forme manje bioaktivne, logično je da se jedan od smjerova razvoja enzima usmjerio i prema ß-glukozidazama, iz raznih gljivičnih sojeva, koje bi dovele do oslobađanja čiste, puno aktivnije forme resveratrola.

4.4. Glukanaze

Glukanaze su enzimi koji hidrolitički razgrađuju visoko polimerizirane polisaharide ß-glukane u manje, linearne polisaharide. U vinarstvu su posebice korisni u dva slučaja: tijekom dozrijevanja vina na talogu (autoliza stanica kvasaca — otpuštanje polisaharida i manoproteina) i pri hidrolitičkoj razgradnji ß-glukana nastalih zbog djelovanja *Botrytis c.*
Polisaharidi u moštu i vinu potječu iz bobica grožđa, staničnih stijenki (celuloze, hemiceluloze, pektina) i iz staničnih membrana kvasaca. Iz kvasaca se polisaharidi otpuštaju tijekom njihovog rasta ili tijekom autolize (beta-glukani). Preparati koji sadrže kombinacije β-(1→3)- i β-(1→6)-glukanaza efikasno hidroliziraju ß-glukane staničnih membrana kvasaca i time ubrzavaju razgradnju membrana kvasaca i oslobađanje njenih gradbenih komponenti.
Neki sojevi bakterija kiselog mliječnog vrenja (*Pediococcus* spp.) i gljivice *Botrytis cinerea* produciraju viskozne kapsulirane nakupine ili vanstanične polisaharide koji ometaju filtriranje. Koloidni polisaharidi ne podliježu flokulaciji, ne mogu se vezati na adsorbente, a ne mogu se otkloniti ni filtriranjem pa je jedino rješenje primjena glukanaza.

Dva tipa glukanaza su bitna za djelovanje na celulozu jer nakon njihove aktivnosti nastaju spojevi koji olakšavaju i pospješuju i bistrenje i filtriranje.

Egzoglukanaze cijepaju glukanske lance uz oslobađanje glukoze kao produkta hidrolize. Endoglukanaze kataliziraju intramolekularnu hidrolizu ß-glukana uz oslobađanje oligosaharida.

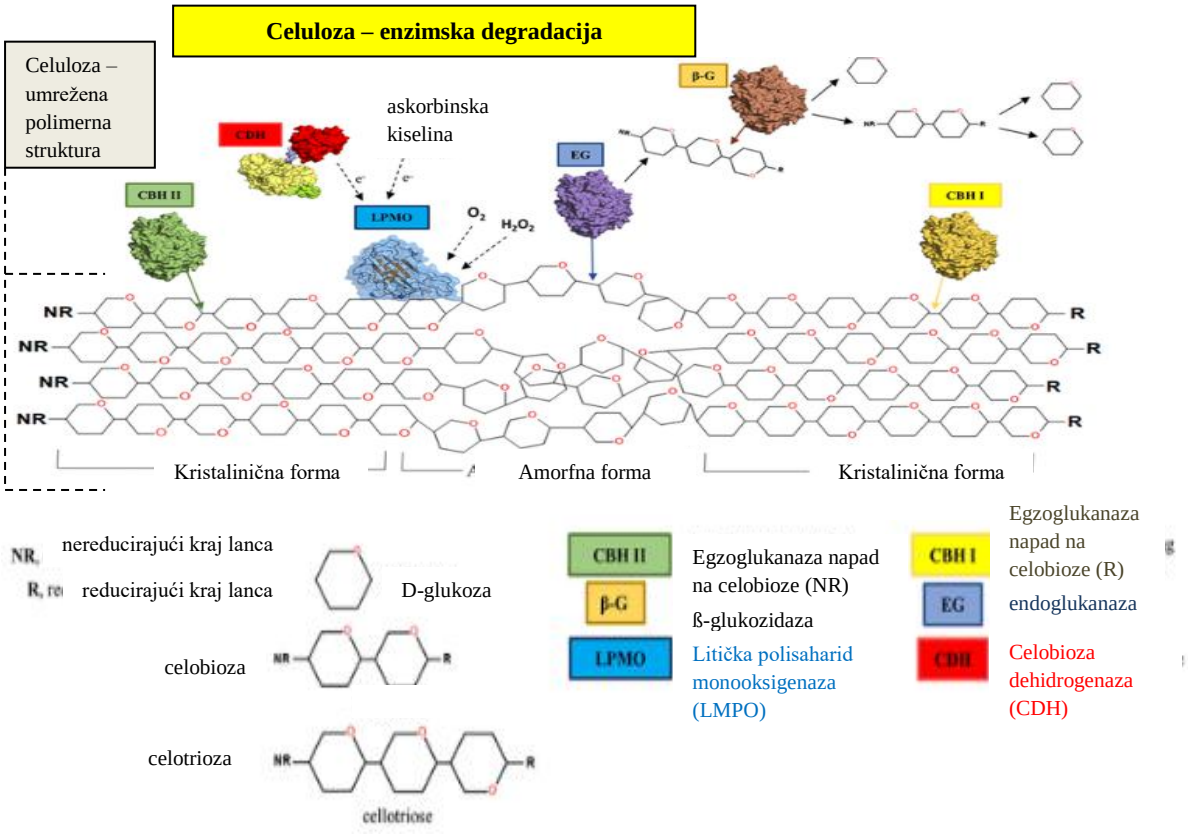
Enzimi obično ne djeluju pojedinačno već u formi enzimskog kompleksa kojeg tvore: **Egzoglukanaze**, svojim djelovanjem na celulozu potiču nastajanje celobioze i glukoze. Dodatno razgrađuju i fragmente celuloze nastale pod djelovanjem endoglukanaza. **Endoglukanaze**, nasumično kataliziraju razgradnju glikozidnih veza u celulozi. Ova vrsta enzima također razbija ksiloglukane u hemicelulozne grupe.

Egzo(1→3)-ß-glukanaze i **(1→6)-ß-glukanaze** razaraju glukane koje stvara *Botrytis cinerea*. Botritis djeluje već na grozdu, a njegovi nepoželjni spojevi iz bobica zaraženih sivim, ali i plemenitim plijesnima prelaze kasnije i u mošt i inficiraju ga.

Optimalne temperature pri kojima su ovi enzimi najefikasniji su između 30 do 50 ºC i kiselosti od pH 4,5 do 6,0.

Komercijalni preparati glukanaza korisnih za vinarstvo se pripravljaju iz posebno selektiranih sojeva *Trichoderma harzianum.*

Primjer usmjernog djelovanja celulaza na celulozu, dan je na Prikazu 4.2.



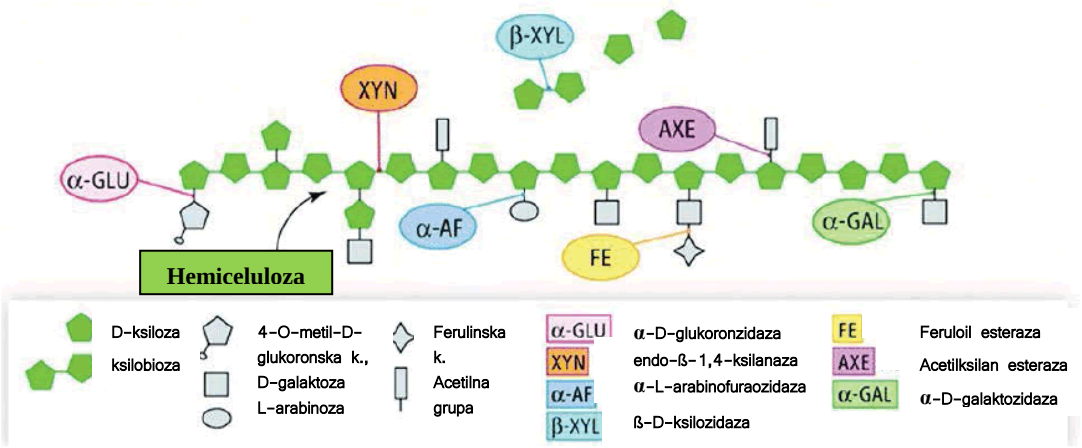
Prikaz 4.2. Shema enzimske degradacije celuloze pod sinergijskim djelovanjem: endo i egzoglukanaza, ß-glukozidaza, celobioza dehidrogenaza i lignolitičkih enzima.

Preuzeto iz: Andlar et al. (2018).

4.5. Hemicelulolitički enzimi – hemicelulaze

Hemiceluloze su klasa polisaharida koja jako varira i po sastavu monosaharida i po stupnju grananja. Ksiloglukani, ksilani i arabinoglukoronoksilani su nađeni kao polisaharidne gradbene hemicelulitičke komponente staničnih stijenki bobica.

Hemicelulaze su grupa enzima koja omogućuje hidrolizu hemiceluloze i njenih gradbenih elemenata: ksiloglukana, ksilana i arabinana. Ksilan je jedan od najzastupljenijih ugljikohidrata na planeti Zemlji. Potpuna razgradnja ksilana postiže se uzajamnim djelovanjem: endo-β-1,4-ksilanaza, β-D-ksilozidaza, α-D-glukoronzidaza, α-L-arabinofuranozidaza i posebnih esteraza i galaktozidza, Prikaz 4.3.



Prikaz 4.3. Shematski model enzimske razgradnje hemiceluloze

Preuzeto iz: Magdadi M., (2017).

Dominantni hemicelulitični enzimi su:

• **endoksilanaze (ß-D-ksilan ksilanohidrolaza**) hidrolizira ß-d-ksilano-piranosil veze ksilana, što dovodi do nastajanja ksiloze i ksilooligosaharida (ksilobioze).

• **ß-D-ksilozidaza (ksilan 1,4-ß-ksilozidaza)**. Više sinonima se koristi za ovu klasu enzima: ksilobiaza, beta-ksilozidaza, egzo-1,4-beta-ksilozidaza, beta-D-ksilopiranozidaza, beta-ksilozidaza, egzo-1,4-ksilozidaza, egzo-1,4-beta-D-ksilozidaza, 1,4-beta-D-ksilanska ksilohidrolaza. Ovaj enzim katalizira hidrolizu ksilana u ksilobiozu (disaharid ksiloznih monomera) ili ksilooligosaharide, na nereducirajućim krajevima hemiceluloze, što dovodi do nastajanje hidrolizata, šećera D-ksiloze. Opaženo je da hidroliza pektina komercijalnim pektinazama ili celulazama rezultira produktima koji su isti kao produkti nastali razgradnjom hemiceluloze.

Nađeno je da neki organizmi, u funkciji sirovine za proizvodnju komercijalnih enzimskih preparata, produciraju multikomponentne smjese, uključivo ksilanaze i ksilozidaze. Gljivica *Penicillium funiculosum* producira smjesu enzima koja uključuje: α-L-arabinofuranozidazu, 1,4-ß-D-ksilanazu, ß-D-ksilozidazu i 1,3-1,4-ß-D-glukanazu. *Penicillium oxalicum* producira kompleks koji sadrži kompletan enzimski celulitičko-ksilanolitički sustav.

4.6. Proteaze

Enzimi proteaze su proteolitičke hidrolaze koje razgrađuju proteine. Proteini (bjelančevine) su biomakromolekule izgrađene od amino kiselina povezanih peptidnim vezama. Proteaze su enzimi koji cijepaju peptidne veze u proteinima, i mogu biti endo- ili egzopeptidaze.

Proteini u mošt i vino dolaze iz gradbenih struktura grožđa i stanica mikroorganizama (kvasaca, bakterija). Drugi važan izvor su proteinski aditivi (lizozimi, albumini, želatina, kazein) koji nažalost mogu ponekad uzrokovati alergijske reakcije pri konzumaciji vina u čijoj su pripravi korišteni. Većina ovih proteina, ali ne svi, se izgubi do završetka fermentacije i slijednih procesa dorade kakvoće vina (bistrenje, filtriranje, stabilizacija). Međutim neke vrste patogeno aktivnih proteina: posebne ß-glukanaze, hitinaze i taumatin-proteini, i nadalje mogu zaostati u vinu. Ovi opasni proteini nastaju u biljci kao odgovor na bakterijsku ili gljivičnu infekciju ili kao reakcija na abiotički stres. Zbog svoje kompaktne strukture ovi proteini su otporni na kiseline vina, toplinu i proteolizu. U kombinaciji s drugim sastojcima vina, proteini iz patogenih mikroba mogu izazvati neželjenu mutnoću, posebice bijelih vina. Takva neželjena promjena ima znatni negativni ekonomski i promocijski učinak.

U praksi se još uvijek za otklanjanje ove greške koristi dodatak bentonita, ali je taj proces povezan s gubitkom kvantitete i kvalitete vina. Bentoniti su kemijski aktivni pozitivno nabijeni izmjenjivači na koje se u različitom stupnju adsorbiraju proteini. Proteini koji su pozitivno nabijeni pri pH vina (oko 3,5) i/ili izrazito glikozilirani, poput lakaza (nastalih pod djelovanjem botritisa) se teže vežu na bentonite. Stoga se logično nameće potreba za nalaženjem rješenja za efikasnije uklanjanje proteina iz vina. U svrhu zamjene za bentonite istraživana su djelovanja proteolitičkih enzima. Iako proteaze, koje su izlučili mikroorganizmi koji obitavaju na bobicama, ostaju naglašeno aktivne pri uvjetima koji vladaju u moštu i vinu (pH i povišeni alkoholi), takve proteaze ne utječu uvijek dovoljno na smanjenje sadržaja proteina.

Kako efikasnost prirodno prisutnih enzima nije dovoljna da se riješi problem prevelike prisutnosti proteina, tretman posebnim proteazama omogućuje minimalni gubitak volumena i aroma. Gljivične proteaze dobivene iz *Aspergillus sp*. (aspergiloglutaminične peptidaze) pokazale su dokazano dobre rezultate (Australsko vinarstvo).

Non-Saccharomyces kvasci su važan izvor enzima koje tijekom fermentacije otpuštaju u mošt/vino uključivo i proteaza. Sojevi *Metschnikowia pulcherrima* i *Wickerhamomyces anomalus* izlučuju aspartat proteaze koji su u ispitivanjima pokazale dobro djelovanje na razgradnju proteina.

4.7. Lizozim

Lizozim je enzim koji je poznato prirodno sredstvo antimikrobne zaštite i već se jako dugo koristi u medicini i industriji hrane (sirevi, vino). Rast mikrobioloških organizama u moštu i vinu se uobičajeno kontrolira dodavanjem sumporovog dioksida.

Međutim, prisutnost sulfita u alkoholnim pićima, posebice u vinu može kod nekih pojedinaca izazvati od pseudoalergijskih reakcija, probavnih smetnji do anafilatičkog šoka. U praksi se koriste i druga antimikrobna sredstva, sorbinska kiselina i dimetil karbonat, koja su aktivna u zaštiti od gljivica, ali ne i od bakterija. Lizozim (lizozim hidroklorid) izaziva jaku enzimsku hidrolizu peptidoglukana staničnih stijenki bakterija, a to rezultira razgradnjom stanične građe bakterija i njihovom smrću. Lizozimi su vrlo djelotvorni u zaštiti od „gram pozitivnih" bakterija. No „gram negativne" bakterije (bakterije octenog vrenja) su relativno otporne na djelovanje ovih enzima. Komercijalni lizozimi se proizvode iz bjelanjka kokošjih jaja, i dozvoljeno je njihovo korištenje u vinarstvu (OIV 2001.). No, pokazano je da gram pozitivne bakterije sojeva *Pediococcus* sp., *Lactobacillus* sp. i *Oenococcus oeni* nisu dovoljno efikasno hidrolizirane lizozima iz bjelanjka jajeta. Kao moguća alternativa izvora efikasnijih lizozima pokazali su se sojevi gljivica *Streptomyces*. Iz njih dobiveni enzimi pokazuju široki spektar bakterolitičkih aktivnosti i pod standardnim uvjetima vinifikacije.

Lizozim se pretežito koristi pri inhibiranju ili pokretanju procesa jabučno/mliječnog vrenja, koji uzrokuju i kontroliraju bakterije jabučno/mliječnog vrenja. Takva tehnologija se posebice preferira kod vinifikacije crnih, ali i nekih bijelih vina.
Četiri najčešće primjene lizozima u tom procesu, i preporučene doze su: a) prije početka jabučno/mliječnog vrenja (rano dodavanje 100 do 150 mg/l), b) potpuna inhibicija djelovanja bakterija i sprječavanje pokretanja jabučno/mliječnog vrenja (500 mg/l),
c) zaštita vina tijekom fermentacije u nepovoljnim uvjetima (250 do 300 mg/l),
d) stabilizacija vina nakon završenog jabučno/mliječnog vrenja (250 do 300 mg/l). Zaostali lizozim se može eliminirati dodavanjem aditiva među kojima su najefikasniji bentoniti i meta-tartarna kiselina.

4.8. Ureaze

Povećana količina ureje u vinu nastaje pod djelovanjem kvasaca. Urea je glavni predšasnik etil karbamata, nepoželjnog spoja koji dokazano ima i kancerogeni potencijal.
Tijekom jabučno/mliječnog vrenja dodatno i bakterije kiselog mliječnog vrenja mogu stvoriti posebne predšasnike etil karbamata, poput karbamoil fosfata ili iz arginina nastalog citrulina. Posebice pri fermentaciji na višim temperaturama, vina mogu sadržavati povišene količine uretana. Zbog toga je važno izabrati odgovarajuću starter kulturu jabučno/mliječnog procesa, izbornog alternativnog pristupa fermentaciji, jer se time može smanjiti nastajanje ureje. Etilkarbamat nastaje i uvijek je prisutan i u drugim fermentiranim pićima i hrani. Maksimalno dozvoljena koncentracija ovog spoja u vinu je često zakonski regulirana. U nastojanju ograničavanja sadržaja ovog spoja, enzimima katalizirano razbijanje ureje nameće se kao rješenje eliminacije nastajanja etil karbamata. Ureaze su uvedene u vinarstvo 1997. godine (EU) kao novi enzimski tretman, ali je bio dozvoljen samo u iznimnim slučajevima. Enzim je razgrađivao ureju u nepoželjni amonijak i ugljikov dioksid. Komercijalni enzim ureaza, izdvojen iz *Lactobacillus fermentum,* se zbog nepoželjnih dodatnih efekata više ne koristi u vinarstvu.

4.9. Upitno djelovanje lipaza

Lipidi u vinu nastaju u bobicama grožđa u fazi njihova rasta i tijekom autolize vinskih kvasaca. Lipidi su po kemijskoj strukturi raznoliki spojevi (masti, ulja, masne kiseline, trigliceridi, voskovi, fosfolipidi i dr.), a osnovna im je zajednička značajka netopljivost u vodi. Poznato je da sastav lipida tijekom fermentacije podliježe značajnim promjenama. Prirodno prisutne lipaze, enzimi koji razgrađuju lipide, su aktivne na granici faza (ulje/voda) emulgirajućih supstrata, koje tvore dugolanačane masne kiseline. Pod djelovanjem lipaza se, na primjer, trigliceridi cijepaju otpuštajući glicerol i masne kiseline. Korisno lipolitičko djelovanje lipaza koje produciraju neki mikroorganizmi detektirano je samo kod malog broja za vino relevantnih *Lactobacillu*s sojeva.
U teoriji lipaze bi se mogle koristiti u vinarstvu za razgradnju lipoidnih staničnih stijenki, i time poboljšati ekstrakciju boje iz crnih sorti grožđa.
Za razliku od lipaza, esterhidrolaze djeluju na topljive estere izgrađene od relativno kratkolančanih masnih kiselina.

4.10. Nepovoljno djelovanje esterhidrolaza i fenoloksidaza

Esterhidrolaze i estersintetaze

Vinski kvasci i bakterije mliječno kiselog vrenja sadrže enzime koji su povezani s formiranjem ili razgradnjom ester**a.**
Estersintetaze (Alkohol-aciltransferaze) potiču sintezu estera, a **esterhidrolaze** (**karboksilne ester hidrolaze)** kataliziraju hidrolizu esterskih veza i njihovu pretvorbu u alkohole i karboksilne kiseline.

Esteri (etil acetat, izoamil acetat, etil heksanat, etil oktanat, etil dekanat) su spojevi koji doprinose vrlo poželjnom voćnom osjetilnom dojmu vina. Oni se sintetiziraju u grožđu, ali nastaju i pod djelovanjem kvasaca tijekom fermentacije. Također su prisutni i **depsidi** koji su po sastavu esteri karboksilnih kiselina ili fenolnih kiselina, esterificiranih međusobno ili povezanih s drugim vrstama karboksilnih kiselina, prisutnih u grožđu (na pr. vinskom kiselinom).

Navedeni esteri i depsidi mogu podleći hidrolizi pod djelovanjem **cinamoil esteraze** („depsidaze“), koja često nastaje kao nusprodukt pri proizvodnji enzimskih preparata iz sojeva *A. niger*. Nastali hidrolitički spojevi mogu imati negativne posljedice po kvalitetu vina.

Enzimski oslobođene fenolkarboksilne kiseline, poput kaftarne ili kumarinske kiseline, mogu metabolički, pod djelovanjem kvasaca, biti pretvorene u hlapljive derivate fenola (4-vinilgvajakol i 4-vinilfenol) koji vinu daju neugodni okusni dojam.
Poželjno je stoga da komercijalni pektinolitički preparati ne sadrže slobodne depsidaze (esteraze).

Fenol hidrolaze i oksidaze

Fenolni spojevi: kaftarna kiselina, galna kiselina, vanilinska kiselina, ferulinska kiselina, a posebice resveratrol su spojevi poznati po svom korisnom pozitivnom djelovanju na ljudsko zdravlje. Osim što po funkciji mogu služiti kao hvatači i neutralizatori reaktivnih radikala oni dodatno aktiviraju antioksidacijske procese u stanici, a imaju i antimikrobna svojstva. Nažalost, enzimima potaknuta oksidacija uzrokuje dramatične nepoželjne promjene fenola, od njihovog nastanka u grožđu pa sve do faze čuvanja vina u boci. Nakon što je bobica grožđa mehanički razorena, fenoli prisutni u moštu bivaju izloženi dodiru sa zrakom i pod djelovanjem enzima fenoloksidaza dolazi do enzimski ubrzanog procesa posmeđivanja. Dvije su klase enzima odgovorne za takve reakcije, tirozinaze koje nastaju u bobicama grožđa, i lakaze koje u mošt dolaze iz gljivica, posebice iz *Botrytis cinerea.*

Tirozinaza je hidrolaza koja hidrolizira monofenole u orto-difenole. Nastali spojevi oksidacijom prelaze u intermedijerne orto-kinone, koji u slijednim koracima polimeriziraju u obojene spojeve (posmeđivanje).

Lakaza je enzim koji oksidira široki spektar različitih fenola i sličnih spojeva, mehanizmom u kojem sudjeluju vrlo reaktivne forme molekula, takozvani radikali.

Tirozinaze i lakaze hidroliziraju i oksidiraju fenole u vinu i time mijenjaju njihova antioksidacijska i antimikrobna svojstva. Lakaze generalno nisu nešto dobrodošlo u vinu.

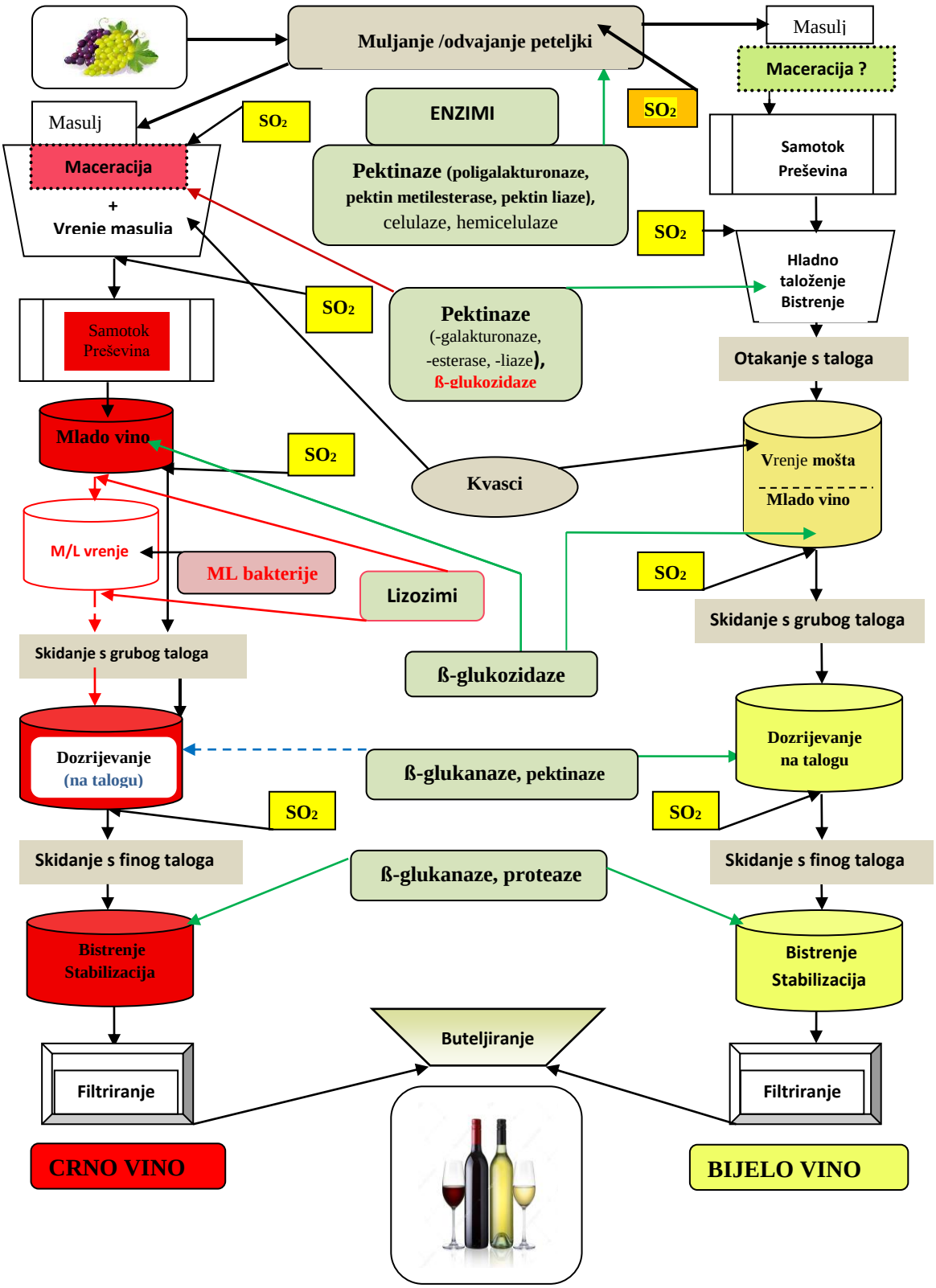
Biogeni amini (BA) su još jedna klasa u vinu nepoželjnih spojeva. Oni potječu iz grožđa ili nastaju tijekom fermentacije pod djelovanjem dekarboksilaza. Njihova uloga u vinu je negativna. Etanol iz vina povećava prisutnost BA inhibirajući enzime koji su odgovorni za detoksifikaciju tih spojeva. Enzimskom razgradnjom biogenih aromatskih spojeva poput: tiramina, feniletilamina, triptamina ili serotonina nastaju intermedijeri koji također podliježu oksidaciji pod djelovanjem lakaza.

Blokiranje djelovanja fenoloksidaza, inicijatora evidentno štetnih procesa oksidacije, već u ranoj fazi priprave mošta, nameće se kao jedan od prioritetnih ciljeva vinifikacijskih procesa. Stoga je berba pri što nižim temperaturama i što ranije dodavanje SO_2, koji inhibira djelovanje fenoloksidaza, imperativ u zaštiti od neželjenih oksidacijskih procesa (posmeđivanja).

5. Praktični pristup korištenju enzima u vinarstvu

Potencijal upotrebe enzima u vinarstvu logično proizlazi iz razmatranja procesa priprave bijelih i crnih vina, i koristi koje njihova upotreba može donijeti. U nastavku je dan prikaz tipičnih tehnoloških procesa vinifikacije i koraci u kojima je preporučljivo koristiti pojedine vrste enoloških enzimskih dodataka, Prikaz 5.1.

Prikaz 5.1. Tipični procesi priprave vina i vrste korisnih enzima.



Detaljnije informacije o koristi pojedinih vrsta enzima proizlaze iz razmatranja koje se vrste enzimske aktivnosti odvijaju u pojedinim procesima vinifikacije i koji se ciljani efekti mogu time postići. U Tablici 5.1. dan je sažetak potencijala primjene za vinarstvo korisnih klasa enzima. U nastavku, Prikazi od 5.2. do 5.7., detaljno opisuju specifikacije komercijalnih preparata korisnih za pojedine faze vinifikacije (enzimi firme Lallemand).

Svaki vinar bi pri izboru enzima trebao razmotriti: ciljano djelovanje enzima, deklariranu namjenu enzima, specifikaciju sastava preparata, doziranje, optimalne uvjete u kojima će enzim efikasno djelovati i profil učinkovitosti pri njegovoj uporabi.

Tablica 5.1. Uloga enzima u vinifikaciji.

Proces vinifikacije	Enzimi	Cilj djelovanja enzima
Poboljšanje prinosa, bistrenja i filtrabilnosti mošta	**pektinolitički enzimi**	smanjenje viskoznosti mošta (manje pektina)
Maceracija i fermentacija masulja (crno vino)	**pektinaze (celulaze, hemicelulaze, ß-glukozidaze)**	hidroliza polisaharida stanične stijenke, poboljšanje maceracije i izluživanja boje, kvaliteta, stabilnost, filtrabilnost
Kasna faza fermentacije (bijelo vino)	**glukozidaze**	Poboljšanje aromatičnosti odvajanjem polimernih šećera iz bezmirisnih predšasnika
Mlado vino	**glukanaze**	autoliza kvasaca – otpuštanje manoproteina iz staničnih stijenki
Problematični mošt	**glukanaze**	razgradnja mikrobnih egzopolisaharida radi poboljšanja bistrenja
Vino	**ureaze**	hidroliza ureje koju su proizveli kvasci, sprječavanje nastajanja etil karbamata
Mošt, vino	**lizozimi**	kontrola umnožavanja ML bakterija
Mošt, vino	**proteaze**	stabilizacija vina uz sprječavanje zamućenja zbog proteina, smanjuje upotrebe bentonita

Preuzeto iz: Guérin L. (2021).

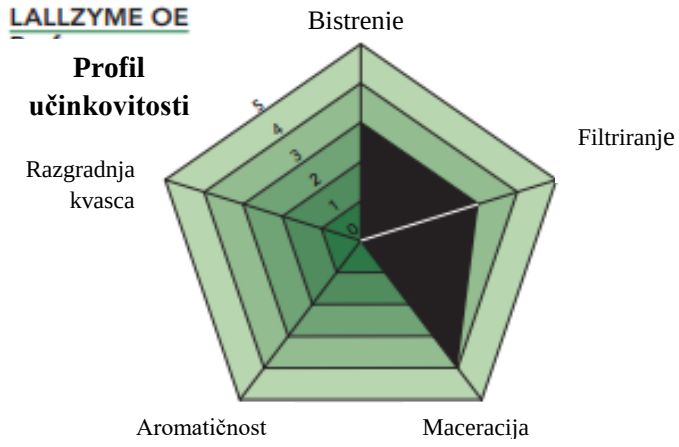
5.1. Predfermentacijske procedure i enzimi

Kožica i pulpa bobica, raznih kultivara loze, variraju u sadržaju pektinskih spojeva, ali uvijek ih imaju u velikoj koncentraciji. Nepotpuna hidroliza spojeva ove vrste od strane endogenih enzima, prirodno prisutnih u grožđu, može izazvati probleme u procesima vinifikacije. No, ako se komercijalni pektolitički preparati dodaju u masulj prije prešanja dolazi do povećanja prinosa i intenziteta boje mošta. Za bistrenje mošta nakon prešanja, također je preporuka koristiti preparate koji sadrže pektinaze. Pektin metilesteraze i poligalakturonaze potiču deesterifikaciju i hidrolizu pektinskih lanaca i ubrzavaju otpuštanje soka iz masulja, a povećava se i količinu samotoka. Dodatno, djelovanje pektinaza ima za posljedicu i skupljanje plivajućih čestica u moštu (flotacija) u veće nakupine i njihovo taloženje pa time i ubrzanje procesa bistrenja. To dovodi i do stvaranja kompaktnijeg taloga. Postoje razne enološke tehnike koje su razvijene s ciljem da vino ima dobre vizualne značajke i stabilnost. Vina koja su prošla tretman s pektinazama pokazuju viši sadržaj antocijanina i fenola, kao i veći intenzitet obojanosti i bistroću.

5.1.1. Maceracija masulja, ocjeđivanje i prešanje mošta

Korištenje pektinolitičkih enzima u fazi priprave masulja omogućuje razgradnju pektina iz kožice bobica, ali i oslobađanje polisaharida iz mesa bobica grožđa. Maceracija masulja (kvašenje mehanički razorenih tkiva bobice) pospješuje: otpuštanje sokova, povećava prinos samotoka i lakše oslobađanje predšasnika aroma. Pektinolitički enzimi se koriste i u svrhu potpore procesu prešanja posebice pektinima bogatih sorti grožđa i sorti koje imaju viskoznu pulpu (sluzavo meso). Enzimi koji ciljano djeluju na kožicu su koncentriraniji u sadržaju pektinaza, u odnosu na enzime za bistrenje, jer trebaju biti aktivniji u razgradnji stanične stijenke. Komercijalni preparati za bijela vina imaju manji udio ovih enzima. Rana primjena maceracijskih pektinaza je obično dostatna i za naknadno bistrenje soka i taloženje. Kod bijelih vina je taloženje i bistrenje ipak efikasnije ako se nakon prešanja dodaju posebni preparati. Prikaz 5.2. (preuzet iz Lallemand tehničke specifikacije enzima) sažetak je opisa djelovanja komercijalnog maceracijskog preparata. Sadrži više informacija koje je poželjno uzeti u obzir pri izboru enzima za praktičnu primjenu pri procesu maceracije: cilj djelovanja, namjenu, specifikaciju sastava, doziranje, uvjete pod kojima je efikasnost enzima optimalna i profil učinkovitosti.

Prikaz 5.2. Tehnička specifikacija i profil djelovanja enzima Lallzyme OE.

<table>
<tr><td colspan="3">CILJANO DJELOVANJE:
Maceracija masulja crnih i bijelih sorti</td></tr>
<tr><td colspan="2">Specifikacija preparata:
poligalakturonaza (PG) 4 500 U/g
pektinmetil esteraza (PME) 1200 U/g
pektin liaza (PL) 85 U/g</td><td>Komercijalni naziv i profil učinkovitosti:

</td></tr>
<tr><td colspan="2">Djelovanje:
Ciljana hidroliza i esterifikacija pektina postiže se djelovanjem optimalne kombinacije pektinaza: poligalakturonaze, pektin esterase, pektin liaze i celulaza. Kombinacija osigurava maceraciju, otpuštanje soka iz stanica bobica, brže bistrenje, lakše prešanje i sukcesivno brže taloženje. Učinkovita je i ekstrakcija boja i predšasnika sortnih aroma.</td><td>Doziranje:</td></tr>
<tr><td>Namjena:
Maceracija
(bijelo grožđe neutralnih sorti)</td><td>Uvjeti (temperatura/vrijeme):
8-14 ºC/2-12 sati</td><td>Preporučena doza:
1,0–1,5 g/hl</td></tr>
<tr><td>Maceracija masulja crnih sorti</td><td>18-28 ºC/2-12 dana</td><td>1 g/hl</td></tr>
</table>

Preuzeto iz: Lallemand, Lallzyme OE (2014).

Mjerenje tehnološke efikasnosti — najrelevantniji indikator efikasnosti je prinos preševine (hektolitar/tona grožđa). Korisno je izmjeriti volumen samotoka, volumen preševine i količinu koma.
U svrhu efikasne maceracije crnih sorti grožđa koriste se složenije kombinacije enzima, koje ubrzano razgrađuju polisaharide stanične stijenke kožice bobica. Komercijalni preparati za ovu svrhu obično sadrže: pektinaze (poligalakturonazu, pektin liazu, pektin metilesterazu) u kombinaciji s celulazama (glukanaze, ß-glukozidaze) i hemicelulazama (ksilanaze, ksilozidaze), što olakšava difuziju tanina iz staničnih vakuola i stijenki. Brzim djelovanjem kombinacije enzima postiže se povećana: ekstrakcija antocijanina i tanina (dublja i stabilnija obojenost), bolja struktura, oslobađanje aroma i predšasnika aromatičnosti. Dodatno se mogu razviti i izraženije antioksidacijske značajke.

Preparati za maceraciju crnih sorti sadrže više hemicelulaza, nego preparati za maceraciju bijelih sorti. Pri vinifikaciji crnih sorti nije preporučljivo koristi iste preparate koji se koriste za bijele sorte, ako je to tehnološki izvedivo. Obojenost crnih vina vezana je na sadržaj antocijanina, koji su stabilizirani vezanjem sa šećerima u kompleksne molekule. Preparati koji sadrže povišene antocijanaze (enzime koji razgrađuju komplekse antocijanina) negativno djeluju na stabilnost boje, uzrokujući nestabilnost pa čak i prijelaz u bezbojno. Enzimi za crne sorte stoga moraju imati deklaraciju da se neće pojaviti antocijanazno djelovanje.
Za maceraciju crnih sorti mogu se upotrijebiti niže koncentracije enzima: ako se maceracija odvija u dugom vremenskom periodu, ako tehnologija vinifikacije omogućuje kružni tok i prelijevanje mošta preko masulja i ako je riječ o maceraciji sorti s tankom kožicom. Povećanje doza enzima potrebno je pri procesima koji se odvijaju na nižim temperaturama ili ako se proces želi ubrzati.

5.1.2. Taloženje i bistrenje mošta

Jedna od prvih primjena enzima u vinarstvu je bila ona za pospješivanje taloženja i bistrenja mošta.
Ciljevi — Mošt je po svojoj prirodi mutni sok nastao nakon prešanja masulja. Količina taloga tog soka, koji se polagano izdvaja na dnu posuda, varira s intenzitetom mehaničkih operacija tijekom prešanja. Prikaz 5.3. sadrži specifikaciju enzima koji pospješuje taloženje. Grubi talog (čestice veće od 200 mikrona) imaju negativni efekt na kvalitetu vina koje se pripravlja. Isto tako i preveliki sadržaj finog taloga (čestice manje od 20 mikrona) šteti kvaliteti i aromatičnosti vina, ali i prevelika bistroća mošta je nepoželjna. Efikasnost enzima u fazi taloženja vina ovisi o: kultivaru, zrelosti grožđa i uvjetima pod kojima se odvija berba i prešanje. Iako do taloženja dolazi i spontano, korisno je promptno nakon prešanja dodati enzime-pektinaze, posebice za neke sorte grožđa (na pr. bijele). Dodavanje enzima uvijek ubrzava proces taloženja. Pektinaze esterificiraju i hidroliziraju pektinske lance, esterificirane i neesterificirane pektine, razgrađujući ih na manje fragmente. Time se postiže znatno sniženje viskoznosti i veća brzina bistrenja mošta. Komercijalni enzimi ubrzavaju proces pa on obično završava u vremenu do 24 sata. Kombinacija pektinaza, prvenstveno poligalakturonaza/pektin esteraza, omogućuje brzo povećanje volumena samotoka, do 10 %.

Poligalakturonaza efikasno razgrađuje samo neesterificirane pektine. Enzim pektin esteraza potpomaže djelotvornosti poligalakturonaze.
Primjena — Enzime treba dodati što je moguće prije po izlasku mošta iz preše. Enzimi mogu biti dodani i ranije, tijekom punjenja preše, pa čak i na masulj. Masulj se mora prije toga zaštiti od oksidacije (SO_2) i držati na odgovarajućoj temperaturi.
Mjerenje tehnološke efikasnosti: intenzitet taloženja može se procijeniti po mutnoći soka, ili izmjerom mutnoće takozvanom nefelometrijom (*Nephelometric Turbidity Units*). Dodatno se može provjeriti efikasnost djelovanja enzima pektin/glukan testom.
Iskustva — Važno je kontrolirati zamućenost (ne prevelika, ne premala) i spriječiti moguće probleme s fermentacijom, a time posljedično osigurati i konačnu kvalitetu vina. Dinamika bistrenja se značajno poboljšava koriste li se enzimi. Najveću uspješnost su pokazali enzimi kada je njima tretirano zdravo grožđe i mošt dobiven od takvog grožđa.

Prikaz 5.3. Tehnička specifikacija i profil djelovanja enzima Lallzyme HC.

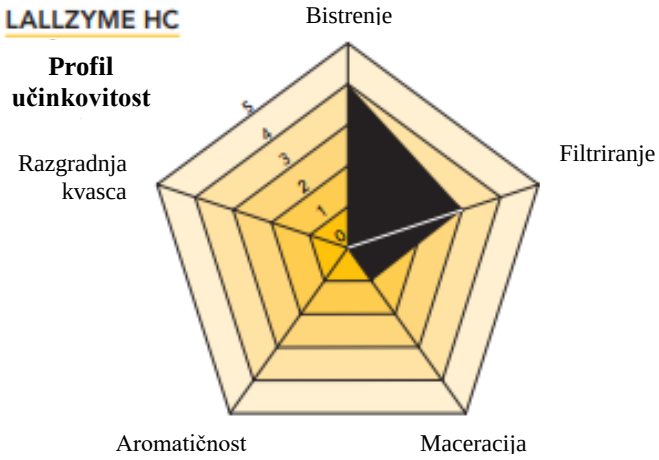
CILJANO DJELOVANJE:

Bistrenje mošta i vina

Specifikacija preparata:
poligalakturonaza (PG) 3 500 U/g
pektinmetilesteraza (PME) 1000 U/g
pektin liaza (PL) 106 U/g

Djelovanje:
Preparat je usmjeren ka bistrenju i flitrabilnosti bijelih vina koja se planiraju prešati i taložiti. Ciljana esterifikacija i hidroliza pektina postiže se djelovanjem optimalne kombinacije triju pektinaza: poligalakturonaze, pektin esteraze i pektin liaze. Kombinacija osigurava brzo i potpuno bistrenje, lakše prešanje i sukcesivno brže taloženje.

Komercijalni naziv i profil učinkovitosti:



Doziranje:

Namjena:	**Uvjeti (temperatura/vrijeme):**	Preporučena doza:
Brzo bistrenje mošta taloženjem	5-20 ºC/3-12 sati	0,5–1 g/hl
Brzo razdvajanje slojeva		1 g/hl
Bistrenje vina	15–25 ºC/1-8 dana	1 g/hl

Preuzeto iz: Lallemand, Lallzyme HC (2017).

Prisutnost *Botrytis cinerea* na grožđu, a posebice glukana koji oni stvaraju, znatno ograničava dobru sedimentaciju taloga. Testiranjem je kod inficiranog grožđa utvrđeno povećanje sadržaja pektina uz smanjenje efikasnosti hidrolize. To se događalo pri upotrebi komercijalnih pektinolitičkih enzimskih preparata ako su dodani na grožđe ili masulj (vrlo visoki sadržaj pektina), a u manjoj mjeri ako su dodani u mošt.

Vođenje procesa prešanja, naročito zaraženog grožđa, mora biti prilagođeno korištenjem posebnih enzima (glukanaza). U protivnome će se vinar sresti s dva problema, kontrolom ekstrakcije i efikasnošću prešanja. Za one kojima je struka bliska korisno bi bilo efikasnost enzima provjeriti pektin/glukan testom (reakcija na smjesu etanol/klorovodična kiselina).

Djelovanje enzima za taloženje se očitava kroz brže taloženje i kompaktniji talog. Efekti variraju: od sorte do sorte, ovisno o dostignutoj zrelosti grožđa i vremenu izlaganja djelovanju enzima. Dodatno, kako djelovanje pektinolitičkih enzima oslabljuje stanične stijenke bobice preporučljivo je pomoći ekstrakciju, otpuštanje predšasnika aromatičnosti, ali i dodatnu kontrolu obojenosti (ekstrakcijom antocijanina), kroz višu koncentraciju pektinaza i eventualnim kombiniranjem s glukozidazama (crne sorte). Iskustveno, rana upotreba enzima skraćuje predfermentacijsku proceduru i omogućuje bolju iskoristivost tehnološke opreme.

5.1.3. Ekstrakcija aromatičnih spojeva

Ova namjena enzima postala je uobičajena, ali rezultati koji se postižu još variraju ovisno o uvjetima pod kojim se provodi vinifikacija. Prikazi 4. i 5. primjeri su djelovanja enzimskih preparata (Lallemand) na masulj i mošt bijelih i crnih sorti grožđa prvenstveno s ciljem povišenja aromatičnosti vina.

Prikaz 5.4. Tehnička specifikacija i profil djelovanja enzima Lallzyme Cuvee-Blanc.

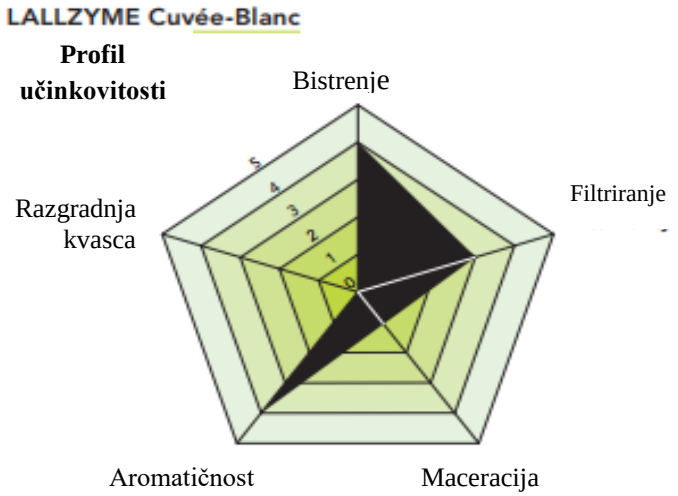
CILJANO DJELOVANJE:

Bistrenje mošta i oslobađanje terpenskih aroma bijelih sorti

Specifikacija preparata:

poligalakturonaza (PG) 1800 U/g
pektin metilesteraza (PME) 500 U/g
pektin liaza (PL) 80 U/g
beta-glukozidaza 400 U/g

Komercijalni naziv i profil učinkovitosti:



Djelovanje:
Pektinaze i niske koncentracije celulaze i hemicelulaze u kombinaciji s beta-glukozidazom imaju niski maceracijski potencijal, ali omogućuju bolje i efikasnije otpuštanje mošta iz masulja i brzo bistrenje nakon prešanja, a zbog sadržaja beta-glukozidaze ovaj preparat povećava aromatsku kompleksnost bijelih sorti.

Doziranje:

Namjena:	**Uvjeti (temperatura/vrijeme):**	**Preporučena doza**:
Dodavanje u masulj bijelih sorti	5-12 ºC/2-12 sati	2 g/hl

Preuzeto iz: Lallemand, Lallzyme Cuvee Blanc (2017).

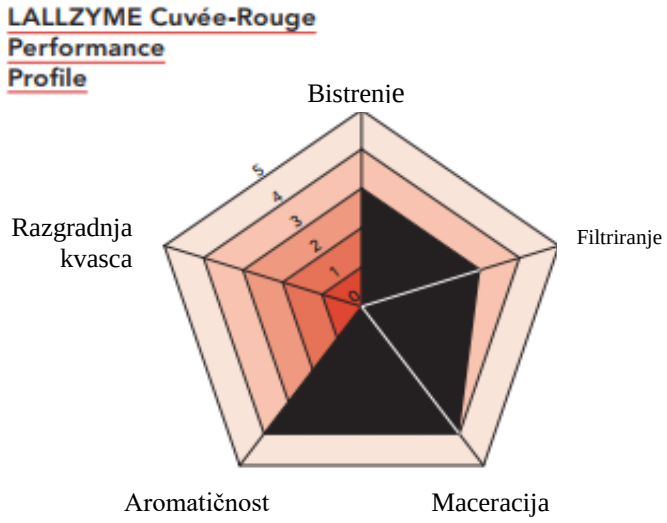
Pri djelovanju na masulj bijelih sorti boja nije primarni cilj, ali povećanje aromatičnosti i bistrenja jest. Za crne sorte naglasak na maceraciju je prioritetni cilj jer doprinosi i obojenosti i aromatičnosti nastalih vina.
Ciljevi — Korištenje pektolitičkih, celulitičkih, hemicelulitičkih i glikozidaznih enzima tijekom maceracije bijelih i crnih sorti grožđa omogućuje brži i puno efikasniji pristup sadržaju kožice grožđa. Posljedično se dobivaju vina koja su puno bolje strukturirana, koja se lakše bistre i filtriraju, a volumen mošta nakon prešanja je veći.
Primjena — Enzimi za ovu svrhu se dodaju na masulj odmah nakon muljanja bijelih sorti (kratkotrajna maceracija) ili na početku predfermentacijske maceracije masulja crnih sorti (uz homogeniziranje prepumpavanjem i potapanjem).
Iskustva — Ocjenjivanje osjetilne percepcije, ovim klasama enzima tretiranog vina, pokazuje da je vino bolje strukturirano, zaokruženo, voćno i puno stabilnije obojenosti.

Efikasnost otpuštanja antocijanina može se pratiti vizualno i organoleptički, ali i mjerenjem optičke gustoće (na više valnih duljina vidljivog spektra). Maceraciju crnih sorti slijedno prati početak fermentacije mošta u masi masulja i otpuštenog mošta. Period djelovanja enzima je u ovom slučaju uvjetovan ne samo ekstrakcijom fenola iz masulja već ovisi o trajanju fermentacije.

Prikaz 5.5. Tehnička specifikacija i profil djelovanja enzima Lallzyme Cuvee-Rouge.

<table>
<tr><td colspan="3">CILJANO DJELOVANJE:
Pred fermentacijska maceracija masulja crnog grožđa</td></tr>
<tr><td>Specifikacija preparata:
poligalaturonaza (PG) 1500 U/g
pektin metilesteraza(PME)2400 U
pektin liaza (PL) 150 U/g
beta-glukozidaza 300 BGD U/g

Djelovanje:
Preparat je specifična uravnotežena kombinacija, pektinaza i beta-glukozidaza,

ciljano usmjerena na predfermentacijsku maceraciju masulja crnog grožđa. Preparat pospješuje ekstrakciju boje, tanina i oslobađa polisaharide i arome terpena iz njivih predšasnika.</td><td colspan="2">Komercijalni naziv i profil učinkovitosti:

</td></tr>
<tr><td>Namjena:</td><td colspan="2">Doziranje:</td></tr>
<tr><td>Pred-ferementacijska maceracija masulja crnih sorti</td><td>Uvjeti (temperatura/vrijeme):
15-25 ºC/2-6 dana
< 12 ºC/2–6 dana</td><td>Preporučena doza:

2-3 g/hl</td></tr>
</table>

Preuzeto iz: Lallemand, Lallzyme Cuvee Rouge (2017).

Iako su antocijanini osjetljivi, labilni spojevi, oni postaju stabilniji nakon što se povežu s taninima u kompleksne strukture.
Međutim, zapaženo je da celulaze koje uključuju pojedine vrste ß-D-glukozidaza razaraju antocijanine. Zbog toga je bitno koristiti ß-D-glukozidaze s niskim afinitetom prema flavonoidima. Ispitivanja su pokazala da je ovakvo neželjeno djelovanje enzima pojačano ako se tretira nedovoljno zrelo grožđe. Varijabilni rezultati efikasnosti enzima na zrelom grožđu ovisili su o kultivaru, godištu i izabranoj tehnologiji vinifikacije. Usprkos nekim dvojbama, zbog upitnog djelovanja na antocijanine, razvidno je da se korištenjem kombinacije pektolitičkih i glukozidaznih enzima postižu korisni efekti. Prvenstveno povišen volumen samotoka i poboljšano bistrenje i filtrabilnost, a tretirana vina crnih sorti imaju izraženiji taninski okus, bogatiji sadržaj polisaharida i stabilniju obojenost.

5.2. Postfermentacijsko poboljšanje aromatičnosti i osjetilnog dojma vina

Predšasnici (prekursori) važnih mirisnih spojeva se u grožđu i moštu pojavljuju u bezmirisnim formama kemijskih spojeva. Terpeni su važna grupa spojeva s izrazitim aromatičnim značajkama, ali njihovi su predšasnici glikozidnim vezama povezani s različitim šećerima u bezmirisne spojeve. Oslobađanje mirisnih komponenti, razdvajanjem takozvanih aglikona od šećera, postfermentacijski, u fazi dozrijevanja vina, mogu katalizirati glikozidaze. Primjena ovih enzima pospješuje i ubrzava dobivanje vina s intenzivnijim aromama.
Ciljevi — Komercijalni enzimski preparati s namjenom povećanja izričaja aromatičnosti sadrže razne glikozidaze koje omogućuju otpuštanje vezanih aroma: ß-glukozidazu, α-L-arabinozidazu, α-L-ramanozidazu i ß-D-apiozidazu. Proces se odvija mehanizmom koji uključuje međusobno zavisnu sinergiju, a ukupni rezultat ovisi o prisutnosti svih triju glikozidaza.
Primjena — Korištenje posebne klase ß-glikozidaznih enzima usmjerenih na poboljšanje aromatičnosti, pogodno je za dodavanje nakon što je u vinu već završen proces fermentacije (Prikaz 5.6.). Trajanje djelovanja enzima ovisi o očekivanim efektima na promjenu aromatičnosti. Kontrolu perioda djelovanja enzima i zaustavljanje njihove aktivnosti može se postići naknadnim dodavanjem bentonita ili sumporenjem. Nadzor nad postignutim osjetilnim dojmom najmjerodavniji je kriterij uspješnosti enzima. Moguće je analizirati vrstu otpuštenih i prisutnih aromatskih spojeva, ali i njihovu koncentraciju, no to zahtjeva složeniju analitičku tehniku. Izbor spojeva koje se želi analizirati vezan je prvenstveno na specifične osjetilne značajke sorte koju se proučava.

Iskustva — Mnoga su ispitivanja enzima koji utječu na aromatičnost prvenstveno bila usmjerena na muškatne sorte (muškati, traminci, rizling i td.) koje sadrže naglašene primarne arome terpenskog porijekla. Glikozidaze je pogodno dodati u već odvrelo vino ili vino koje ne sadrži više od 50 g/l neprevrelog šećera.
Puno manje koncentracije terpena prisutne su i u bijelim sortama (Sauvignon, Semillon, Chardonnay i td.), ali i kod nekih crnih sorti. Korištenje enzimskih preparata za poboljšanje aromatičnosti zahtjeva pažljivi nadzor radi izbjegavanja pretjerane promjene aromatičnosti.

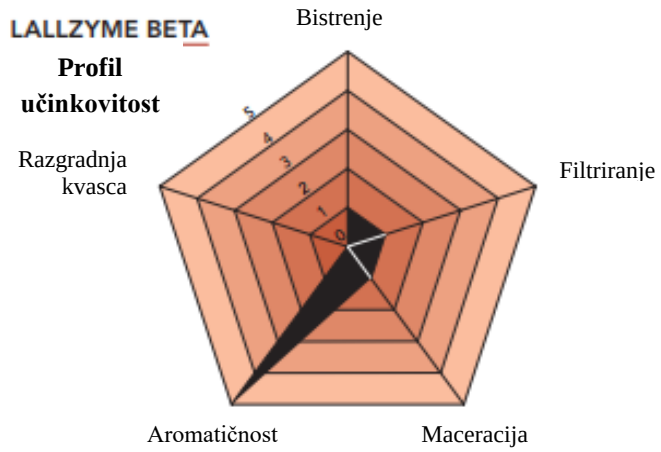
Prikaz 5.6. Tehnička specifikacija i profil djelovanja enzima Lallzyme Beta

CILJANO DJELOVANJE:

Povećanje aromatičnosti već odvrelog vina

Specifikacija preparata:
poligalaturonaza (PG) 590 U/g
pektin metilesteraza (PME) 180 U
pektin liaza (PL) 5 U/g
beta-glukozidaza 1500 BGDU/g

Komercijalni naziv i profil učinkovitosti:



Djelovanje:
Ovaj enzimski preparat posjeduje vrlo jako glikozidazno djelovanje, zbog ciljanog povećanje arome bijelih vina. Što je u odvrelom vinu veći sadržaj predšasnika aroma veći je rezultat tretmana, jače će biti nastajanje aroma terpena. Enzim daje dobre rezultate ako se primjeni kod muškata i traminca, ali i drugih aromatičnih sorti vina.

Doziranje:

Namjena:	**Uvjeti (temperatura/vrijeme):**	**Preporučena doza**:
Bijela vina aromatičnih sorti	najmanje 12 ºC/najmanje 3 tjedna	5 g/hl

Preuzeto iz: Lallemand, Lallzyme Beta (2017).

Ponekad u uvjetima koji vladaju pri normalnim vinifikacijskim procesima hidroliza ß-glukozidazama može biti manje efikasna. Događa se da su rezultati pri korištenju ovih enzima u praksi upitni, puno slabiji ili čak izostanu (ovisno o sorti i godištu).

Stoga je jedan od izazova i ciljeva koji stoje pred razvojem novih vrsta enzima unaprijediti djelovanje ß-glukozidaza na način da nema upitne efikasnosti njihove djelotvornosti.
No, čak i kada efikasnost nije izražena višom koncentracijom slobodnih aroma, u stvarnosti enzimi uvijek mijenjanju profil osjetilnih značajki vina. Uloga enzima u povećanju aroma vina se temelji na oslobađanju hlapljivih mirisnih spojeva iz predšasnika koji su bilo cisteinilizirani ili glikozilirani derivati.

U Tablici 5.2. prikazani su enzimi koji su uključeni u oslobađanje sortnih aroma više vrsta bijelih i crvenih vina. Tablica sadrži vrste aromatičnih hlapljivih spojeva koji nastaju pod djelovanjem enzima, osjetilni dojam koji nastaje nakon otpuštanja aromatičnih spojeva i sorte vina pri kojima se otpuštaju za njih specifične arome.

Tablica 5.2. Enzimi koji se koriste za oslobađanje aroma vina.

Enzimi	Vrste oslobođenih aromatičnih (hlapljivih) spojeva	Osjetilni dojam	Sorta vina
ß-D-glukozidaza, α-L-arabinozidaza, α-L-ramanozidaza, ß-D-apiozidaza	Terpeni/ α-terpineol, geraniol, nerol, linalol, citronelol	voćni i cvjetni mirisi	muškat, mirisni traminci, rizling
	Ostali/ C6 spojevi, alifatski alkoholi, derivati benzena, hlapljivi fenoli	biljne arome	bijela vina
	Norizoprenoidi/ ß-damaskenon, 3-hidroksi-ß-damaskon dihidro-α-ionon 3-okso-7,8-dihidro-α-ionol	travnate, čajne, lipa i medne arome	Chardonnay, sirah, merlot, Cabernet Sauvignon
	Norizoprenoidi/ 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen (TDN), (E) -1-(2,3,6-trimetilfenil, buta-1,3-dien (TPB)	arome petroleja	rizling
ß-liaza, alkohol acetiltransferaza	Tioli/ 4-merkapto-4-metilpentan-2-on (4-MMP), 3-merkaptoheksan-1-ol (3-MH), 3-merkaptoheksil acetat (3MHA)	grejp, crni ribiz, marakuja	Sauvignon blanc, muškat, mirisni traminac, rizling, Chardonnay

Preuzeto iz: Ottone et al. (2020).

5.3. Dozrijevanje vina na talogu

Danas sve popularniji pristup povećanju kvalitete vina u postfermentacijskoj fazi pored enzimskog povećanja aromatičnosti uključuje i kontrolirani proces dozrijevanja vina na talogu.

Pristup povećanju kvalitete vina, njegove punoće, strukture, zaokruženosti i ukupnog osjetilnog dojma, pospješuje proces dozrijevanja vina na talogu (engl. aging on lees).

Tijekom procesa fermentacije u moštu, koji se postepeno pretvara u vino (alkoholi), stalno raste broj kvasaca (jednostaničnih organizama), ali istovremeno počinje i stalno traje odumiranje dijela njihove populacije.

Razgradnja kvasaca, spontana autoliza njegovih staničnih membrana, izgrađenih iz glukana, hitina i manoproteina, rezultira oslobađanjem i otpuštanjem tih gradbenih spojeva u prisutni tekući medij (voda, alkoholi, kiseline i otopljeni šećeri).

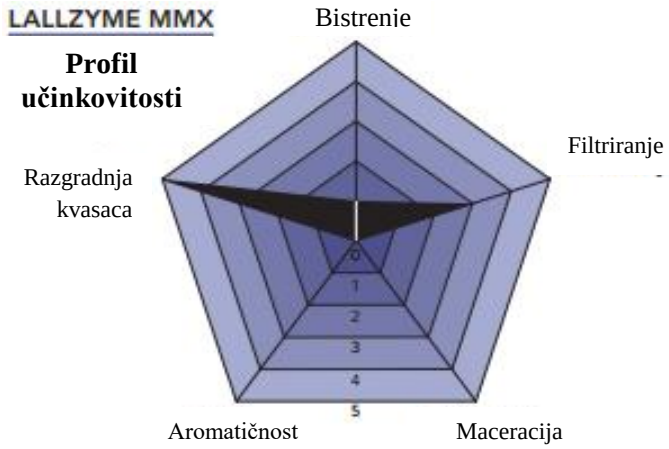
Glukani i hitin su netopljivi, ali manoproteini su djelomično topljivi u vinu.

Autoliza kao prirodni proces teče vrlo sporo, ali dodatkom enzima glukanaze i hitinaze taj proces se znatno ubrzava. Dodani enzimi pospješuju hidrolizu glukana, a ubrzava se i oslobađanje manoproteina.
Komercijalni enzimski preparati pripravljeni s ciljem ubrzanja autolize kvasaca sadrže ß-glukanazu i poligalakturonazu, Prikaz 5.7., a ponekad i pektin liazu i pektin esterazu.

Prikaz 5.7. Tehnička specifikacija i profil djelovanja enzima Lallzyme MMX.

CILJANO DJELOVANJE:

Poboljšano dozrijevanja vina na talogu – razgradnja kvasaca i lakše filtriranje

Specifikacija preparata:	**Komercijalni naziv i profil učinkovitosti:**
poligalakturonaza 29000 nkat/g ß-glukanaza 80 BGXU/g	
Djelovanje: Preparat je smjesa beta-glukanaza i pektinaza (poligalakturonaza) i ima svrhu skraćivanja i poboljšanja dozrijevanja na talogu (otpuštanje manoproteina, polisaharida i peptida). Vina dobivaju punoću, bolji oralni osjetilni dojam i zaokruženost. Zbog sinergijskog djelovanja glukanaza i pektinaza preparat pospješuje i filtrabilnost vina zaraženih botritisom	

Doziranje:

Namjena:	**Uvjeti (temperatura/vrijeme):**	**Preporučena doza**:
Crna vina dozrijvanje na talogu	10-15 ºC/najmanje 6 tjedana	4-5 g/hl
Bijela vina dozrijevanje na talogu	10-15 ºC/najmanje 6 tjedana	2-3 g/hl
Pjenušci dozrijevanje na talogu	10-12 ºC/najmanje 3 mjeseca	1 g/hl
Filtriranje vina bogatih glukanima (botritis)	10-15 ºC/najmanje 6 tjedana	2-3 g/hl

Preuzeto iz: Lallemand. Lallzyme MMX (2021).

Primjena ovakvih formulacija enzima rezultira bržim oslobađanjem manoproteina, poboljšanjem taloženja i stabiliziranjem boje i aroma vina. Pored procesa razgradnje stanične membrane kvasca dolazi i do oslobađanja unutarstaničnih spojeva, posebice polisaharida, peptida i aminokiselina. Za vinarstvo su posebice interesantni manoproteini jer tijekom i nakon fermentacije stabiliziraju vinsku kiselinu i proteine, poboljšavaju oralni osjetilni dojam i smanjuju trpkost. Preporuča se i korištenje manoproteina i hitina u funkciji vezivanja i otklanjanja nepoželjnih spojeva i teških metala.

Polisaharidi s prisutnim polifenolima stvaraju kompleksne spojeve, a to doprinosi poboljšanju ukupnog osjetilnog dojma vina, većoj kompleksnosti, punoći i zaokruženosti oralnog osjetilnog dojma.
Ciljevi — Dodavanje enzima potiče ubrzavanje procesa autolize kvasaca, koji u talogu zaostaju po završenoj fermentaciji, pri čemu se iz membrana oslobađaju topljivi manoproteini, a razgradnjom membrane se oslobađaju i unutarstanične komponente (amino kiseline, peptidi, nukleotidi, polisaharidi i td.). Procesi se ubrzavaju korištenjem odgovarajućih formulacija enzimskih preparata koji sadrže i poligalkturonazu i glukanazu.
Primjena — Enzimi se dodaju nakon završene alkoholne fermentacije u vino koje je u kontaktu s finim talogom, a ponekad i kada je u kontaktu i s grubim talogom. Najbolja ocjena uspješnosti enzima je okusni dojam, ali i mjerenje prisutnosti polisaharida.
Iskustva — Iako se ovakvi enzimski preparati uglavnom koriste pri vinifikaciji bijelih vina, sve više se koriste i u crnim vinima.
Ovi enzimski preparati ubrzavaju autolizu kvasaca, ali i poboljšavaju bistrenje i olakšavaju filtriranje. Prikaz 5.7. sadrži tehničku specifikaciju i profil djelovanja komercijalnog preparata koji je preporučen za dodavanje u vino koje stari na talogu, ali i za olakšavanje filtriranja u slučajevima povećane prisutnosti glukana (*Botrytis c.*).

5.4. Postfermentacijsko bistrenje i olakšavanje filtriranja

Zbog prisutnosti kompleksne matrice koloida, čestica mutnoće, filtriranje kao proces kojim se završava vinifikacija ima veliku važnost, svoju složenost, delikatnost i cijenu. Koloidi tvore stabilne čestice mutnoće koje po prirodi spojeva mogu biti različitog porijekla: proteini, polisaharidne makromolekule, glukani nastali ako je grožđe inficirano botritisom, zaostali mikroorganizmi itd. Usprkos raznim procesima bistrenja, tijekom vinifikacije, u vinu je na kraju ponekad prisutna mutnoća koju je teško eliminirati. Strategije za prevenciju nastajanja mutnoće, koje reduciraju korištenje bentonita, mogu se temeljiti na više procedura i mogu uključiti: smanjivanje ionizacijskog potencijala vina, smanjivanje koncentracije polifenola u vinu, korištenje ultra filtracije i enzimski tretman vina pri kraju vinifikacije. Smanjivanje ionizacijskog potencijala ili smanjenje sadržaja polifenola nisu preporučljive metode jer dramatično mijenjanju osjetilne značajke vina. Eliminiranje proteina koji uzrokuju mutnoću korištenjem enzima izgledno je najkorisnija metoda jer minimalno utječe na gubitke volumena vina i ne mijenja mu aromatičnost. Enzimski preparati korisni za potporu procesu bistrenja, nakon okončane fermentacije, se često navode i pripisuju istoj klasifikacijskoj grupi kao i enzimi koji se koriste za taloženje mošta. No, postfermentacijsko djelovanje nije istovjetno predfermentacijskom jer u su moštu prirodno prisutni pektini u odvrelom vinu već razgrađeni.

Odlučujući faktor za odabir enzima, u ovoj fazi vinifikacije, je njegovo efikasno djelovanje na razbijanje i cijepanje postraničnih lanaca, vezanih na osnovnu polimernu strukturu spojeva stanične stijenke, a ne napad na homogalakturone.

Pektinolitički enzimi koji se koriste u predfermentacijskoj proceduri ipak u nekoj mjeri potpomažu bistrenje i filtrabilnost vina. Djelovanje enzima koji se koriste za dozrijevanje na talogu kvasaca također olakšavaju i filtriranje.

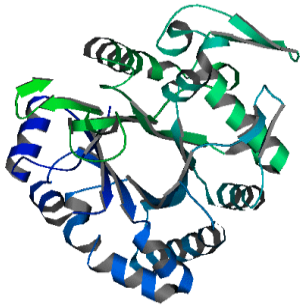
Olakšavanje filtriranja vina zahtjeva upotrebu ß-D-glukanaza (endo i egzo ß-D-glukanaza) i preparate bogate pektinolitičkim enzimima. Ovi preparati razgrađuju i proteine i koloide kompleksne građe. Jednim dijelom se u ovu svrhu mogu koristiti preparati opisani Prikazom 5.7.

Ocjena uspješnog filtriranja je mjerljiva kroz procjenu vremena u kojem se neki volumen vina može profiltrirati ili volumenom vina koje se profiltrira u jedinici vremena. Dodavanjem selektiranih enzima može se čak udvostručiti volumen vina u odnosu na vino koje se filtrira bez dodavanja enzima. Trošak dodanih enzima lako se nadoknađuje uštedama na troškovima filtriranja.

Posebni problem predstavljaju mutnoće koje su nastale ako je za vinifikaciju korišteno grožđe zaraženo *Botrytisom c*., sivom ili plemenitom plijesni. *Botrytis cinerea* uzrokuje povećanu produkciju visoko molekularnih ß-1,3 i ß-1,6-glukana, koji se tijekom dozrijevanja formiraju na površini grožđa, a tijekom vinifikacije prelaze u mošt i vino. Nastale glukane nije moguće hidrolitički razgraditi ako na njega djeluju samo prirodno prisutni endoenzimi ili ako se primjene uobičajeni procesi bistrenja ili centrifugiranja. Razgradnja je učinkovita ako se za degradaciju glukana koriste komercijalni enzimski preparati koji sadrže egzo-(1→3)-β-D-glukanaze (Prikaz 5.8.) i egzo-(1→6)-β-D-glukanaze. Proces razgradnje problematičnih glukana prirodno traje više od 5 mjeseci, a komercijalni preparati ga skraćuju na 2 do 3 tjedna. Iste glukanaze razgrađuju i druge polisaharide koji su gradbeni elementi stanične membrane kvasca.
Vina tretirana preparatima koji sadrže ß-glukanaze mogu pokazati i poboljšanje mirisnih osjetilnih značajki, povećava se koncentracija hlapljivih spojeva, posebice: etil estera, 2-feniletanola, heksanola i trans-3-heksanola.

Glukanaze je korisno dodati u mlado vino, odmah po završenoj alkoholnoj fermentaciji, i osigurati da enzimi djeluju u trajanju od 7 do 10 dana, pri temperaturi višoj od 10 ºC. Za crna vina treba povećati doziranje glukanaza jer fenoli iz tih vina mogu inhibirati djelovanje enzima. Na sličan način se rješavaju problemi pri posebnoj tehnološkoj varijanti, procesa termovinifikacije.

Prikaz 5.8.
1,3-ß-glukanaza.



Preuzeto iz: https://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/date/1ghs.html

5.5. Sumarni pregled – enzimi i njihova uloga u vinarstvu

Teorijsko razumijevanje odnosa između djelovanja enzima i tehnoloških procesa, u moderna vremena, sve više postaje temelj vinarskoj praksi. Tri su kategorije enoloških enzima danas dominantne, najviše se koriste i nude na tržištu:

• Uporaba pektinolitičkih enzima je najzastupljenija u vinarstvu. Enzimima ove klase prvenstveno pripadaju: poligalakturonaze, pektin liaze i pektin metilesteraze. Njihova funkcija je razgradnja pektina bobice grožđa, ali imaju i značajni efekt na maceraciju i bistrenje (depektinizaciju). Preparati, kojima su osnova pektinolitički enzimi, često sadrže i hemicelulaze (ksilanaze) i celulaze (ß-glukozidaze, glukanaze). Ovi dodatni enzimi su obično prisutni u manjim koncentracijama.
• Preparati glukozidaza djeluju na otpuštanje aromatičnih spojeva, posebice terpenola.
• Preparati koji sadrže glukanaze imaju usmjereno specifično djelovanje na razgradnju stanične strukture kvasaca. Pri tome dolazi do otpuštanja polisaharida, ali i glukana ako je grožđe bilo zaraženo botritisom.

U nastavku, Tablica 5.3., je dan sumarni prikaz doprinosa specifičnog djelovanja pojedinih vrsta enzima na fazne procese vinifikacije.

Tablica 5.3. Teorijske relacije vrsta enzima i njihov potencijalni doprinos procesima vinifikacije.

Enzimi		**Predfermentacijski procesi**				**Postfermentacijski procesi**		
		taloženje	**bistrenje**	**prešanje**	**maceracija/ ekstrakcija**	**povećanje aromatike**	**filtriranje**	**dozrijevanje**
Pektinaze	**Poligalakturonaze (PG)**	■	■	■	■		■	
	Pektin liaze (PL)	■	■	■	■		■	
	Pektin metil esteraze (PME)	■	■	■	■		■	
	galaktanaze		■				■	
Hemicelulaze	**ksilanaze**			■	■			
Celulaze	**endo-(1-4)-ß-D-glukanaza**			■	■		■	■
	egzo-(1-4)-ß-D-glukanaza			■	■		■	■
Glikozidaze	**ß-D-glukozidaza**			■	■	■		
	α-L-arabino furanozidaza			■	■	■		
	α-L-ramanozidaza			■	■	■		■
Glukanaze	**egzo(1-3)→(1-6) ß-D-glukanaza**		■				■	■

Preuzeto iz: Guérin and Pallas (2021).

6. Enološki faktori i uvjeti koji utječu na efikasnost enzima

Temperatura — Enzimi su po strukturi proteini, velike polimerne kompleksne strukture koje gube svoj strukturni i funkcionalni integritet (denaturacija) na temperaturama višim od 60 ºC. Kod preniskih temperatura, ispod 5 ºC enzimi više nisu dovoljno aktivni. Optimalne temperature za korisno djelovanje enoloških enzima leže između 30 i 60 ºC. Pri temperaturama nižim od 30 ºC enzimi su i dalje efikasni, ali ne iskazuju svoju maksimalnu efikasnost.

Vrijednost pH — Gotovo svi enološki enzimi su aktivni u rasponu vrijednosti pH vina od 2,8 do 5,0 iako je optimalni raspon vrijednosti pH enoloških enzima nešto širi od 3,0 do 6,5.

Tolerancija na SO_2 — Aktivnost enzima je inhibirana u prisutnosti SO_2. Pri tome se potpuna blokada djelovanja enzima javlja ako je koncentracija sumporovog dioksida veća od 500 mg/l. Pri sukcesivnom dodavanju sumporovog dioksida i enzima dobro je da između postoji neki vremenski razmak.

Bentoniti — Ovi pripravci adsorbiraju proteine pa zbog toga inaktiviraju i enzime. Već i mala doza bentonita (5 do 10 g/hl) može zaustaviti djelovanje enzima.

Enološki tanini — Istraživanja su pokazala da se tanini mogu vezati na proteine, vodikovim i hidrofobnim vezama. Logično je da se i enzimi, koji su posebno strukturirani i specifično funkcionalni proteini, prisutni u komercijalnim preparatima ponašaju istovjetno, odnosno da se i tanini vežu na enzime i inhibiraju njihovo djelovanje.

Doziranje enzima — Potrebna doza enzima koju treba koristiti za optimalnu efikasnost mora se procijeniti temeljem: količine supstrata koji želimo kemijski transformirati, vremena raspoloživog za postizanje djelotvornosti, i temperature. Količina enzima potrebnog za postizanje efikasnog djelovanja pri niskim temperaturama može se kompenzirati povećanjem doze. Logično je i da premala doza postaje djelotvornija ako povisimo temperaturu.

7. Ishodišni mikroorganizmi i forme komercijalnih enzimskih preparata

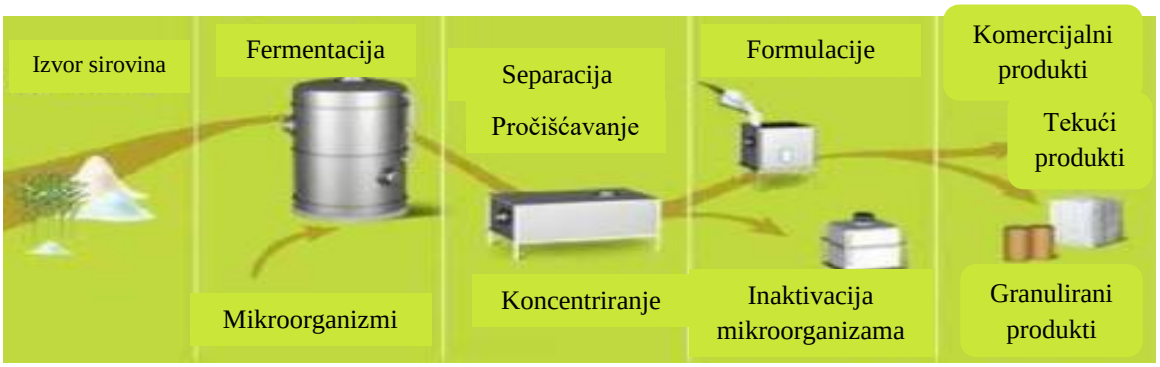
Premda su enzimi prisutni i djeluju u svim živim organizmima, isplativi izvori enzima koji služe za pripravu preparata u industrijskim razmjerima su mikroorganizmi: bakterije i gljivice. Ovi mikroorganizmi obitavaju u različitim prirodnim staništima poput šuma, planina, fjordova itd. Enzimi interesantni za vinarstvo dolaze uglavnom od gljivičnih vrsta mikroorganizama *Aspergillus* i *Trichoderma*. Svaka ova vrsta uključuje mnoge sojeve, koji imaju različite potencijale biosinteze enzima. Na primjer, poznato je da postoji preko 10000 sojeva gljivica *Aspergillus niger*. Među interesantnim i sigurnim mikroorganizmima koji produciraju enzime dobrih značajki, pod uvjetima koji vladaju u vinarstvu, su i: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* i *Bacillus licheiformis* jer produciraju korisne enzime, uključivo: glikozidaze, pektinaze i proteaze.

Postoji više tehnoloških procesa kojima se mogu pripraviti enzimski preparati: kontrolirana fermentacija u tekućem mediju ili na krutom supstratu. Slijedni proizvodni procesi uključuju: separaciju biosintetiziranih enzima od mikroorganizama, koncentriranje, stabilizaciju, pročišćavanje, formuliranje kombinacija više vrsta enzima, preradu u granulate (prah) ili tekuće otopine. Jedna od korisnih tehnoloških operacija je pročišćavanje preparata od prisutnosti cinamoil esteraze (koja potiče nastajanje hlapljivih fenolnih supstrata odgovornih za nepoželjne mirise) i antocijanaza (koje kvare obojenost vina). Tijekom završnih faza procesa proizvodnje komercijalnih preparata moguća je i priprava kombinacije više vrsta enzima – takozvano „formuliranje“. Na kraju proizvodnog procesa enzimski koncentrati se oblikuju u stabilnu, primjenski upotrebljivu i marketinški prilagođenu formu. Enzimi se isporučuju bilo u formi granulata (praha) bilo u formi otopine – tekućine.

Na Prikazu 7.1. shematski su prikazane faze proizvodnje komercijalnih enzimski preparata.

Tekući enzimski preparati se moraju čuvati na niskim temperaturama (idealno na 4 ºC). Time im se zadržava funkcionalnost, ali rok upotrebljivosti im je nažalost ograničen na 24 mjeseca, od datuma proizvodnje. Prednost ove forme preparata je da mogu biti dodani direktno u mošt ili vino. Granulirani preparati (prah) mogu se u originalnom tvorničkom pakiranju čuvati do 4 godine, ali ih je prije uporabe potrebno rehidrirati, otopiti u vodi (prema uputama proizvođača).

Prikaz 7.1. Komercijalni enzimski preparati – shematski prikaz faza proizvodnje.



Preuzeto iz: Guérin and Pallas (2021).

8. Zakonska regulativa

Proizvodnja vina se smatra dijelom industrije hrane i stoga je podložna istim zakonskim propisima. Među velikim brojem komercijalnih enzima, u vinarstvu dominiraju enzimi ekstrahirani iz kultura sojeva gljivica *Aspergillus niger*. Taj mikroorganizam smatra se opće prihvatljiv kao siguran (engl. GRAS – generaly recognized as safe), bez opasnih nuspojava i prihvatljiv po „zelenim" kemijskim značajkama. Enzimi koje produciraju ove gljivice su aktivni i stabilni pod uvjetima koji vladaju u vinarstvu. Zakonska regulativa koja definira upotrebu enzima u proizvodnji vina unutar Europske unije regulirana je od strane organizacije OIV (International Organisation of Vine and Wine). Pojedinačne rezolucije definiraju: opće aspekte enzima u vinarstvu, dozvoljeno djelovanje enzima, modalitete primjene i metode mjerenja efikasnosti enzima. U nekim državama (SAD, Kanada, Kina) upotreba enzima u vinu podliježe nacionalnim regulativama.

Označavanje i sadržaj etikete za pojedine enzimske preparate određeni su posebnom uredbom OIV-OENO 485-2012.

U nastavku su iz uredbi OIV - Enzimske preparacije navedeni EU obvezujući temeljni dokumenti i aneksi (revizija) za pojedine klase enzima.

Enzymatic Preparations–Revizija–OENO 365/2009, OENO 485/2012, Izvorno-oeno 340/2010, oeno 488/2013.
Beta-Glucanase
Revizija–OENO 27/2004, Izvorno-oeno 5/2005,
Urease
Revizija–OENO 5/2005, Izvorno-oeno 5/2007, oeno 451/2012, oeno 489/2012,
Glycosidase
Revizija–OENO 5/2007, OENO 451/2012, OENO 489/2012, Izvorno-oeno 6/2007, oeno 487/2013,
Cinnamoyl Esterase Activity
Revizija–OENO 6/2007, OENO 487/2013, Izvorno-oeno 8/2008, oeno 486b/2012,
Cellulase
Revizija–OENO 8/2008, OENO 486b/2012, Izvorno-oeno 9/2008, oeno 363/2012,
Pectinmethylesterase Activity
Revizija–OENO 9/2008, OENO 363/2012, Izvorno-oeno 10/2008, oeno 364/2012,
Polygalacturonase Activity
Revizija–OENO 10/2008 OENO 364/2012, Izvorno-oeno-313 2009-oeno 4902012,
Galactanase Activity
Revizija–OENO 313/2009, OENO490/2012, Izvorno-oeno 314/2009, oeno 491/2012,
Pectinlyase Activity
Revizija–OENO 314/2009, OENO491/2012, Izvorno-oeno 365/2009, oeno485/2012,
Beta-Glucanase Activity (β1-3, β1-6)
Revizija–OENO 340/2010, OENO 488/2013, Izvorno-oeno 412/2012

9. Razvoj enoloških enzima

Enzimi u formi komercijalnih pripravaka su već dobro uhodana strategija za poboljšanje volumnog prinosa i kvalitete vina. Trenutačno se koriste enzimi koji se pretežito izdvajaju iz sojeva *Aspergillus* gljivica, a u mošt ili vino se prakticira dodavanje smjese više enzima.
S motrišta potrošača najvažnije je dobro izabrati enzimski preparat, selektivnog, ciljanog i efikasnog djelovanja, ali i to da se za njegovu proizvodnju koriste prirodni, ekološki prihvatljivi materijali. Kvasci prirodno prisutni na grožđu pokazuju se sve izglednijim ishodnim materijalom za pripravu enološki interesantnih enzima. Takvi kvasci mogu imati funkciju produkcije novih vrsta enzimskih preparata, ali se mogu koristiti u dvostrukoj funkciji ako se koriste i kao enzimsko-fermentacijske „starter“ kulture. To se poklapa s rastućim trendom proizvodnje vina uz pomoć kvasaca koji ne pripadaju u porodicu *Saccharomyces cerevisiae*.

Većina spojeva koji su nositelji specifičnih osjetilnih značajki vina nastaju ili trpe promjene tijekom vinifikacije, u reakcijama potaknutim enzimima. Enzimima potaknute transformacije imaju vrlo važnu ulogu i u tehnološkoj efikasnosti različitih faza vinifikacijskih procesa. Iako je puno napora uloženo u razvoj novih vrsta enzima ostaje niz još uvijek neriješenih problema, na primjer stabilizacija proteina koji su uzrok mutnoće bijelih vina. Obećavajući rezultati su postignuti korištenjem novih selekcija gljivičnih sojeva, kao ishodnog materijala za proizvodnju enzima, ali i osloncem na molekularnu biologiju koja generira modificirane kvasce i bakterije s optimalnim enzimskim aktivnostima.

9.1. Enzimi danas

Enzimi su moćni biokatalizatori, biotehnološki alat koji znatno povećava efikasnost pojedinih procesa vinifikacije i doprinosi kvaliteti vina. Njihova korist nije uvijek lako mjerljiv efekt, posebice zbog promjenljivosti uvjeta vinifikacije i varijacija ishodnog materijala grožđa. Pročišćeni enzimi mikrobiološkog porijekla, proizvedeni u formi komercijalnih pripravaka, se sve više koriste u vinarstvu jer njihova uporaba pridonosi mnogim poboljšanjima i sve to s minimalnim neželjenim popratnim efektima i za relativno nisku cijenu. Enzimski pripravci povećavaju prinos mošta, poboljšavaju aromatičnost stvarajući vina specifičnih sortnih osjetilnih značajki, doprinose boljem ukupnom osjetilnom dojmu, ubrzavaju ekstrakciju boje crnih vina iz macerata, optimiraju brzinu enzimski potaknutih enoloških procesa, a doprinose i lakšem otklanjanju nepoželjnih koloidnih čestica, uzročnika mutnoće, tijekom procesa stabilizacije i filtracije. Neki spojevi prisutni u grožđu i vinu: sulfiti, etanol i biogeni amini ometaju efikasnost djelovanja enzima.

Zbog vrlo složene prirode enzima, strukturne kompleksnosti i mikrobiološki varijabilnog porijekla, nije uvijek moguće provjeriti efikasnost (lako dostupnim analitičkim metodama) specifičnog djelovanja i popratne efekte enzimskih preparata, uključivo i negativne (na pr. cinamol esteraze izazivaju nepoželjno povećanje sadržaja metanola).

Poteškoće nastaju i pri usporednoj procjeni komercijalnih produkata iz različitih izvora. Znanja o procesima pri proizvodnji enzima, uključivo separaciju, filtriranje i pročišćavanje pri završetku procesa njihove priprave, sugeriraju da je sadržaj nusprodukata u komercijalnim preparatima mali ili zanemarivo mali. Samim time je i opasnost od reakcija na te nusprodukte, uključivo i alergijske, vrlo mala.

U današnja vremena potrošači preferiraju zdravu, minimalno procesiranu hranu, ali i vino, jasne deklaracije i bez skrivenih rizika.

9.2. Ciljevi razvoja novih vrsta enoloških enzima

Kvaliteta vina je usko povezana s enzimima koji se koriste u vinarstvu. Razvoj novih vrsta enoloških enzima je usmjeren prema korištenju specifično, ciljano usmjerenih djelovanja i na traženju rješenja koja bi bila višestruko korisna vinarima:

• glikozidaza, glukanaza, arabinofuranozidaza u funkciji oslobađanja terpenoidnih aroma
• enzima iz bakterija, koji mogu reducirati formiranje biogenih amina (bez lizozima)
• ß-glukozidaza koje bi povećale produkciju resveratrola (sinteza stilbena)
• glukanaza, pektinaza, ksilanaza i arabinofuranozidaza za kontrolu flokulacije i taloženja
• proteaza usmjerenih na poboljšanje stabilnosti proteina i bistrenje

• glukoza oksidoreduktaza – Klimatske promjene planetarnih razmjera, suše i zatopljenje, imaju za posljedicu rađanje grožđa s visokim udjelima šećera, što dovodi do porasta sadržaja alkohola u vinima novijih godišta. Visoki sadržaj alkohola ima za posljedicu veći negativni zdravstveni utjecaj na one koji takvo vino konzumiraju, ali i na kvalitetu vina zbog narušene uravnoteženosti njegovih temeljnih sastojaka. Posljedica takvih događanja je trend prema proizvodnji vina koja bi imala kontrolirani, sniženi sadržaj alkohola. Dodavanje glukoza oksidaza (glukoza oksidoreduktaza), moglo bi se koristiti za snižavanje sadržaja glukoze u moštu i posljedično za smanjenje alkohola u vinu (1 do 2 %). Za sada je teško govoriti o korištenju ove vrsta enzima u praksi jer osim ciljanog efekta smanjenja alkohola javljaju se nepoželjni efekti koji remete procese fermentacije, utječu na kiselost, stabilnost boje i mijenjaju osjetilne značajke vina.

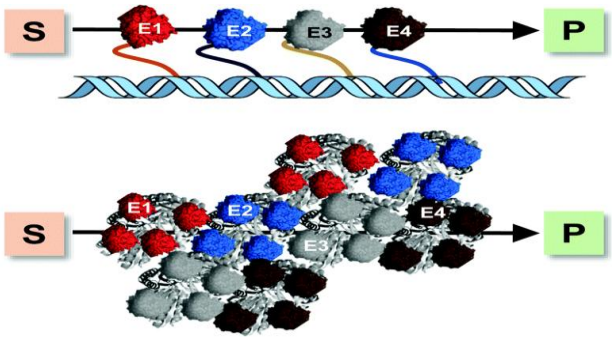
• tanaza (hidrolaza taninske kiseline) – Tanaza se pokazala kao interesantna vrsta enzima koja ima potencijal smanjenja taninima uzrokovanih zamućenja vina. Ovaj enzim katalizira hidrolizu esterskih veza tanina, poput hidrolize taninske kiseline, što rezultira oslobađanjem glukoze i galne kiseline. Tijekom dozrijevanja vina u hrastovim bačvama dolazi do otpuštanja hidrolizirajućih tanina iz drva. Ti tanini su značajan izvor trpkosti i gorčine vina. Tanaza hidrolizira takve tanine, onemogućuje njihovu polimerizaciju i time osigurava nastajanje vina visoke kakvoće, visoku aromatičnost i stabilnu obojenost.
Sprječavanje polimerzacije tanina osigurava brže i efikasnije bistrenje.
Dodatno, tanini se mogu vezati s proteinima, inducirajući time mutnoću koju je teško eliminirati. Dodavanjem tanaza, procesi polimerizacije tanina i proteina se efikasno sprečavaju. Time se uspješno osigurava bistroća vina, u fazi njegovog dozrijevanja i starenja.

9.3. Nove generacije biokatalizatora

U svijetu biotehnologija i bioinženjerstva veliki napredak je postignut u razvoju ne samo novih vrsta enzima već i u pronalaženju novih mehanizama njihovog djelovanja. Razvijene su nove inovativne tehnologije: korištenja multienzimskih sustava, korištenja višestupanjskih, kaskadnih katalitičkih procesa i vezivanje — imobilizacija i koimobilizacija enzima na nosače.

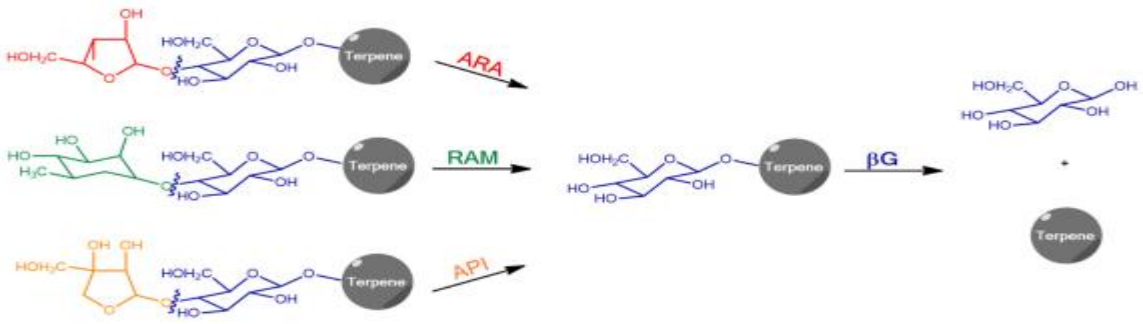
9.3.1. Multienzimski sustavi – Razvojni smjerovi tehnologija novih vrsta enzima uključuju i korištenje kombinacija enzima, multikomplekse enzima, međusobno povezanih na uređeni način unutar definiranog prostora, koji iniciraju više stupanjske katalitičke procese. Reakcijske sustave koji kombiniraju dva ili više uzastopnih stupnjeva kemijske reakcije, unutar istog prostora, bez izdvajanja reakcijskih intermedijera nazivamo kaskadnim reakcijama. Multienzimske kaskade uključuju nekoliko biokatalitičkih koraka, koji se mogu odvijati simultano ili u nizu. U slučaju simultanog odvijanja procesa svi enzimi i svi reagensi–supstrati su prisutni od početka procesa i svi se reakcijski koraci odvijaju u istom prostoru. U slučaju sekvencijskog mehanizma, pojedini enzimi ili supstrati se dodaju ili aktiviraju (primjena imobiliziranih ili koimobiliziranih enzima) nakon što je određena sekvenca (reakcijski korak) kompletirana. Kaskadne reakcije umnogome ovise i od prostornog obrasca razmještaja pojedinih enzima u enzimskim kompleksima. U varijanti takozvanih linearnih kaskada produkt jednog reakcijskog koraka služi kao supstrat slijednog katalitičkog koraka. U ovoj vrsti kaskadnog djelovanja se izbjegava izoliranje intermedijera čime se povećava ukupno iskorištenje, količina nastalog produkta, a štedi se vrijeme i resursi.
Neke kategorizacije kaskadnih procesa, osim linearnih kaskada, spominju i: ortogonalne (konverzija supstrata u jedan produkt, uz povezane sekundarne reakcije koje služe za eliminiranje nusprodukata), paralelne i cikličke kaskade.

Grafička ilustracija kaskadnog enzimskog djelovanja dana je na slijednim prikazima, Prikazima 9.1. Linearna kaskada (teorijski) i 9.2. Dvostupanjska kaskada (praktični primjer).



Prikaz 9.1. Multienzimska biokatalitička kaskada (linearna).

Preuzeto iz:
https://pubs.rsc.org/image/article/2017/OB/c7ob00391a/c7ob00391a-f2_ hi-res.gif



Prikaz 9.2. Shema dvostupanjskog kaskadnog reakcijskog mehanizma u kojem se iz glikoziliranih predšasnika oslobađaju mirisni terpeni i glukoza, pod djelovanjem četiriju enzima: α-L-arabinofuranozidaze (ARA), α-L-ramanopiranozidaze (RAM), ß-D-apiofuranozidaze (API) i ß-D-glukanopiranozidaze (ßG).

Preuzeto iz: Ottone et al. (2020).

Kaskadne reakcije koje su potaknute djelovanjem enzimskih kompleksa zahtijevaju ozbiljno teorijsko razmatranje, koje izlazi iz okvira i ciljeva ovog teksta.

Bavljenje multienzimskim sustavima trenutno spada u sam vrh znanstvenog razvoja biokatalitičkih tehnologija.

9.3.2. Imobilizacija i koimobilizacija enzima

Sinteza multistupanjskih enzimskih kompleksa, koji bi djelovali kroz kaskadni enzimski mehanizam, je još uvijek vrlo zahtjevna strategija koja je ostvariva, među inim, i preko pristupa korištenja enzimske imobilizacije i koimobilizacije.

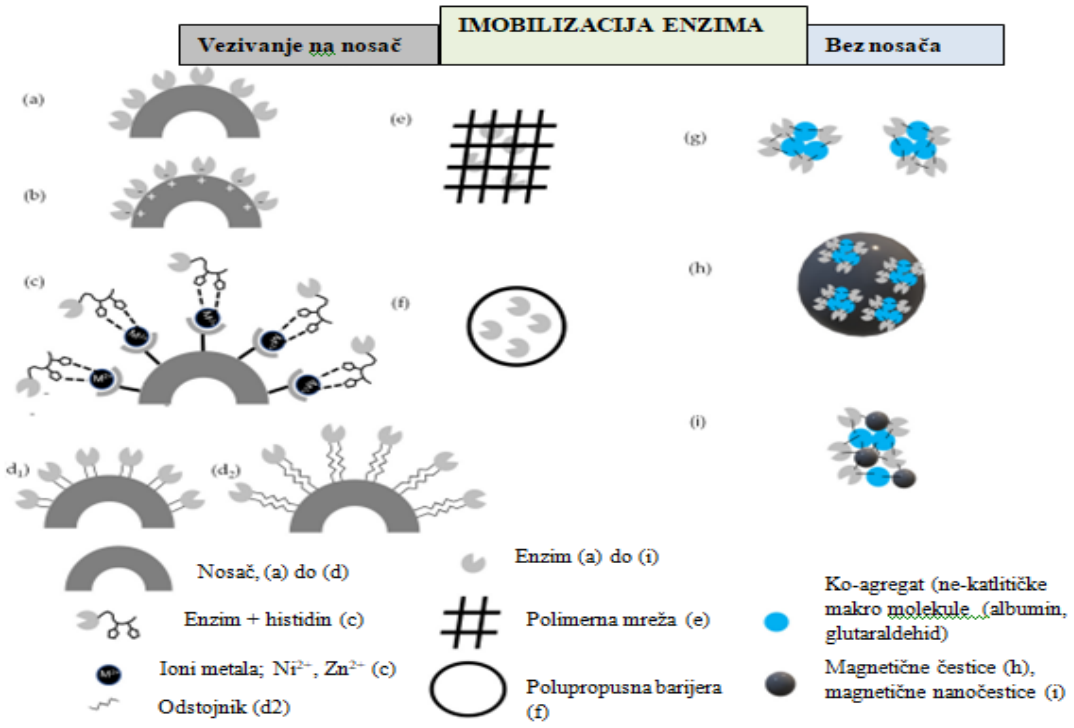
Imobilizacija je tehnika kojom se multienzimski sklop veže na odgovarajući potporni nosač ili se više enzima međusobno povezuje bez nanošenja na nosač (engl. support/carrier). Enzimi su blisko povezani, povećana je enzimska aktivnost, prijenos supstrata se ciljano usmjerava, povećava se ponovna upotrebljivost enzima.

Različite tehnike imobilizacije enzima opisane su Prikazom 9.3.
Imobilizacija može uključiti vezivanje na nosač; slučajevi (a) do (f), i metode bez nosača; slučajevi (g) do (i);

(a) *adsorpcija* — sile kojima su enzimi vezani na nosač uključuju: hidrofobne interakcije, vodikove veze i van der Waalsove sile.
• Prednosti: jednostavne i jeftine preparacije, modifikacija enzima nije potrebna, zadržana maksimalna aktivacija. Moguća je regeneracija nosača.
• Slabosti: enzimi su na nosač vezani slabim silama, podložnost gubitku–curenju enzima (osjetljivost na promjene temperature i kiselosti (pH) i osjetljivost na hidrodinamičke posmične sile). Imobilizacija je nasumična, stabilnost imobilizacije slaba.

(b) *povezivanje ionskim vezama* — negativno (pozitivno) nabijeni enzim vezan je na pozitivno (negativno) nabijen nosač.
• Prednosti: jednostavna i jeftina preparacija. Aktivnost enzima ostaje visoka. Srednje jake veze između enzima i nosača. Obnova nosača moguća.
• Slabosti: manja osjetljivost na curenje enzima, ali osrednja stabilnost imobilizacije

(c) *afinitetno–komplementarno povezivanje* — enzim se selektivno povezuje s metalnim ionima nosača preko histidinskih ostataka (veze prikazane crtkanim linijama).
• Prednosti: usmjerena dobro kontrolirana imobilizacija, izražena specifičnost. Obnova nosača moguća.
• Slabosti: visoka cijena i složenost imobilizacijskog procesa. Posebne grupe se moraju vezati na površinu enzima, a potreban je i poseban komplementarni dodatak.



Prikaz 9.3. Modeli imobilizacije enzima.

Preuzeto iz: Bie et al. (2022).

(d1) *kovalentno vezivanje* — enzim se kovalentno (prikaz – pune linije) veže na aktivirani nosač.
(d2) *kovalentno vezivanje* — enzim je vezan na nosač preko molekula koje osiguravaju sterički razmak (engl. spacer, arm / hr. odstojnik ili razmaknica ili ruka), (prikaz – cik-cak crtice).
• Prednosti: jaka povezanost enzima i nosača. Visoka stabilnost. Pogodna varijanta imobilizacije za dugotrajno korištenje.
• Slabosti: regeneracija nosača nije izvediva. Složenost i visoka cijena imobilizacije. Rizik od gubitka aktivnosti enzima tijekom procesa imobilizacije.

(e) *inkorporacija u polimernu matricu* — enzim je vezan, sputan unutar polimerne mreže (npr. kalcijevog alginata).
(f) *enkapsulacija (barijerno obavijanje*) — enzim je inkorporiran unutar polupropusne barijere (npr. poli (laktid-ko-glikolida, PLGA).
• Prednosti: nema kemijskog vezivanja između enzima i nosača, djelovanje enzima je neometeno. Srednje visoki troškovi i osrednja složenost imobilizacije. Lako se postiže multienzimska imobilizacija.
• Slabosti: difuzija enzima iz polimerne mreže ili enkapsuliranog prostora, sklonost „curenju“ nisko molekularnih formi enzima.

(g) *umreženi enzimski agregat* (engl. CLEA – cross linked enzyme aggregate) — enzim i koagregatne molekule su kovalentno vezane (pune linije) unutar matrice umreživača (npr. glutaraldehida).
• Prednosti: jaka povezanost enzima u agregatu. Relativno jednostavna preparacija. Biokatalizator je odvojen od nekatalitičkog materijala. Multienzimski sustavi su dobro stabilizirani.
• Slabosti: moguć je gubitak aktivnosti, efikasnosti enzima tijekom imobilizacije. Agregat koji ima male pore može otežati difuziju visoko molekularnog supstrata (spoja na kojeg enzim treba djelovati), u unutrašnjost svoje strukture. Tijekom procesa obnove imobiliziranog sustava može u procesu filtriranja ili centrifugiranja doći do stvaranja nakupina koje potom dodatno otežavaju difuziju supstrata u agregat.

(h) *magnetični umreženi enzimski agregat* — agregat je istovrstan kao u prethodnom slučaju, ali je nosač magnetičan.
(i) *magnetični umreženi nano enzimski agregat* — slično kao i pod (g), ali je umreženi enzimski agregat formiran umrežavanjem enzima, koagregata i magnetičnih nanočestica.
• Prednosti: slično ponašanje kao i u slučaju (g), ali uz jednostavnije obnavljanje biokatalizatora, pod djelovanjem magnetskog polja.
• Slabosti: iste kao i kod umreženog enzimskog agregata, ali zbog obnavljanja pod djelovanjem magnetskog polja izbjegnuti su problemi stvaranja grudastih nakupina.

Koimobilizacija enzima uključuje uređenu inkorporaciju, obuhvaćanje više enzima unutar istog prostora, bilo na nosaču, bilo unutar umreženog enzimskog agregata s ciljem njihovog usklađenog i kontroliranog djelovanja, sekvencijski (u nizu) ili u međusobnoj koordinaciji. Stoga u usporedbi s koristima koje donosi imobilizacija, koimobilizacija može omogućiti pojedinačno, odvojeno mikrookruženje za svaki od uključenih enzima, pogodnu prostornu distribuciju i koncentraciju za svaku fazu kaskadnog procesa i blisku povezanost enzima.

Sve to skraćuje duljinu difuzijskih putova i može doprinijeti ukupnom ubrzanju reakcije kroz lakši kontakt sa supstratom. Koimobilizacija može poboljšati iskorištenje–prinos reakcije i optimiranje više parametara za svakog od uključenih enzima, uključivo topljivost, aktivnost i selektivnost djelovanja.

No koimobilizacija, za operacije koje se odvijaju u jednoj procesnoj jedinici, zahtjeva uvjete u kojima svi enzimi mogu razviti odgovarajuću djelotvornost i stabilnost. U protivnom nedostatak takvih uvjeta može djelovati pogubno po efikasnost biokatalize.

Potrebno je i identificirati intermedijerne spojeve čije nastajanje može djelovati štetno po enzime i identificirati slabo topljive ili labilne spojeve jer i oni mogu opteretiti optimalno djelovanje enzima.

Uzevši u obzir sve navedene potencijalne probleme primjene imobiliziranih i koimobiliziranih enzima sužava se izbor situacija u kojima su ti sustavi optimalni, ciljani izbor. Razmatranje svih pro i kontra argumenata preduvjet je odluke o izboru između inovativnih imobiliziranih i koimobiliziranih sustava, koji osiguravaju kompletiranje reakcija unutar jedne procesne jedinice, i konvencionalne višestupanjske procesne metodologije u kojoj se koriste slobodne forme enzima. Koimobilizacija je vrlo preporučljiva kada enzimi djeluju sinergistički, na primjer u procesima: hidrolize polisaharida, kaskadnim reakcijama koje uključuju sekvencijsko modificiranje supstrata radi formiranja bitno različitih produkata, a koimobilizacija je gotovo obvezna u sustavima kada su intermedijerni spojevi nestabilni. U praksi se koriste različite tehnike koimobilizacije;
(a) nasumična koimobilizacija — enzimi su nasumično raspoređeni unutar omeđenog prostora ili su nasumično vezani na nosač ili su nasumično povezani u umreženi enzimski agregat, *(b)*
pozicionirana koimobilizacija — uključuje uređeno slijedno vezivanje enzima na površinu nosača,
(c) *kompartmentalizacija* — uključuje vezivanje pojedinih enzima unutar zasebnih prostora, razdvojenih slojeva kapsule, ali i svih enzima u jedan prostorni kompleks – kapsulu.

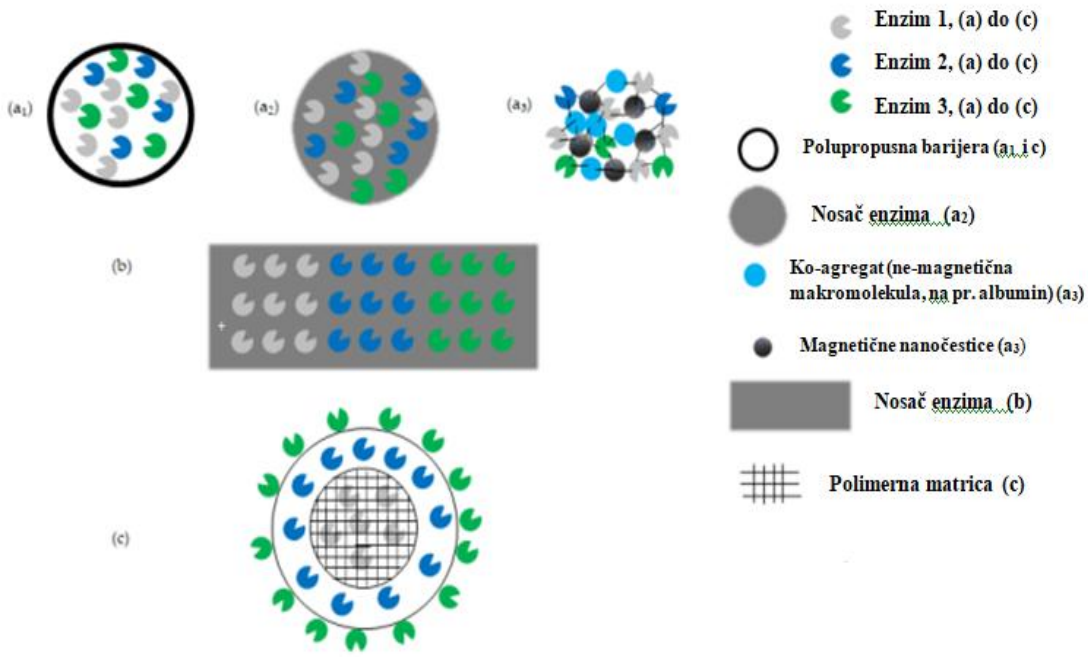
Tehnike multienzimske koimobilizacije opisane su grafički na Prikazu 9.4.;

(a) *nasumična koimobilizacija* — (a1) unutar kapsuliranog prostora omeđenog polupropusnom barijerom enzimi su nasumce porazmješteni,
(a2) enzimi su vezani na površinu krutog nosača, nasumično porazmješteni (veze mogu uključiti: adsorpciju, ionske ili kovalentne veze),
(a3) bez nosača, magnetični kombinirani umreženi enzimski agregat, koagregat i magnetične nanočestice su kovalentno vezane unutar umreživača (npr. glutaraldehida),

(b) *pozicionirana koimobilizacija* — enzimi su vezani na površinu nosača na uređeni način, u nizu koji osigurava odgovarajući redoslijed kaskadnih reakcija. Enzimi mogu biti vezani na unutarnje zidove kapilarnih nanostruktura ili na polimere ili na strukturu DNK,

(c) *kompartmentalizacija (kapsuliranje*) — uključuje strukturiranje više enzima na način koji imitira uvjete koji vladaju u stanicama živih bića.

Na prikazu su enzimi unutar kapsule odijeljeni u zasebne prostore: u unutarnjem odjeljku enzim-1 je uklopljen u polimernu matricu. Obujmljivanjem ovog odjeljka polupropusnom barijerom formira se kapsula, koja drži u klopci i enzim-2. Nakon toga se aktivira vanjska površina kapsule i time omogućuje vezivanje enzima-3 (kovalentnim ili nekim drugim vezama). Koimobilizacija ove vrste uključuje: vezanje enzima u polimernu matricu, kapsuliranje i vezivanje na površinu kapsule.



Prikaz 9.4. Različite tehnike koimobilizacije enzima.

Preuzeto iz: Bie et al. (2022).

Veliki raspon materijala: poroznog ili neporoznog, različitih propusnosti i različite kemijske prirode i afiniteta i različitih potencijala obnovljivosti razvijen je za nosače pri imobilizaciji/koimobilizaciji enzima. Izbori materijala uključuju „klasične“ nosače hidrogele i siliku, ali i nove nanomaterijale, poluporozne materijale, keramiku i adsorbirajuće ionski nabijene porozne nanomaterijale (engl. electrospun materials).

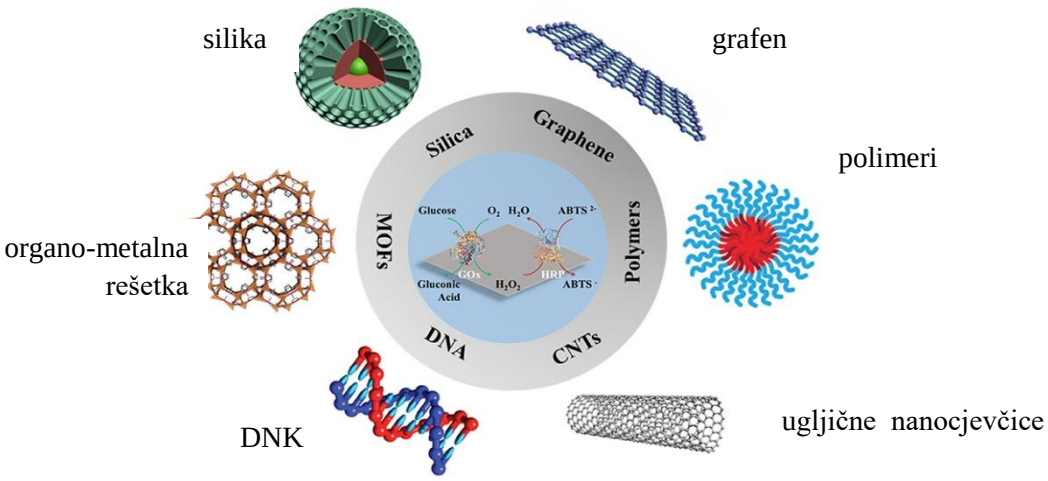
Usprkos mnogih zajedničkih značajki s „klasičnim“ nosačima različiti nanomaterijali uzrokuju drugačije efekte koji uvjetuju razlike u aktivitetu i stabilnosti enzima. Na efikasnost djelovanja enzima utječu i fizička svojstva nanomaterijala (sterička struktura), naglašeni afinitet za vezivanje raznovrsnih kemijskih funkcionalnih grupa i bolja prilagodba uvjetima pod kojima enzimski sklop djeluje, a i to da može biti višekratno upotrebljiv.

„Nosači“ (oslonci) za multienzimsku imobilizaciju

Materijali koji se koriste kao „nosači“ (engl. support), na koje se vežu i imobiliziraju multienzimski sklopovi, imaju vrlo veliki značaj za efikasnost enzima.
Do sada su razvijeni mnogi novi materijali koji se koriste kao efikasni potporni nosači za koimobilizaciju multienzima: grafen, ugljične nanocjevčice (engl. carbon nanotubes – CNT), organo-metalna rešetka (engl. metal-organic framework – MOFs), DNK nanostrukture, sintetski polimeri i silika. Svi ovi materijali efikasno djeluju, ali i štite multienzimske sustave od teških metala, visokih temperatura i drugih opasnih bioloških izazova, poboljšavaju stabilnost i omogućuju višekratnu upotrebljivost.

Koimobilizacija multienzimskih biokatalizatora ima i nedostataka, prvenstveno previsoku proizvodnu cijenu i upitnost u kojoj su mjeri ekološki prihvatljiviji i biokompatibilni materijali koji se koriste kao „nosači“.

Na Prikazu 9.5. shematski su prikazani noviji materijali koji se koriste za multienzimsku imobilizaciju i koimobilizaciju.



Prikaz 9.5. Materijali u funkciji imobilizacijskih nosača multienzima.
Preuzeto iz: Kongliang Xu et al. (2020).

Dizajn koimobiliziranih multienzimskih katalizatora usmjeren je prema praktičnosti njihove primjene na mnogim poljima biotehnologije i bioinženjerstva. Kada će njihova šira primjena postati prihvatljiva i vinarstvu, nije za sada jednostavno odgovoriti.

9.4. Primjena imobiliziranih enzima u vinarstvu

Mnogi komercijalni enzimi su važna komponenta u modernom vinarstvu. Međutim nisu sve enzimske preparacije podjednako korisne i prilagođene uvjetima koji se javljaju u vinifikacijskim procesima. Mnogi od problema koji su povezani s topljivim enzima koji se direktno dodaju u vino su rješivi ako se umjesto njih koriste imobilizirani enzimi.

Imobilizirani enzimi su robusniji, stabilniji, mogu se obnoviti nakon upotrebe, a konačni produkt njihovog katalitičkog djelovanja se lako odvaja od enzimskog sklopa i time nestaju problemi s neželjenom prisutnošću zaostalih enzima–proteina.

Imobilizacija enzima (detaljnije – Poglavlje 9.3.2.)

Imobilizacija je proces kojim se enzim ili više enzima, prije dodavanja u medij podložan enzimskom djelovanju, povezuje međusobno ili se vežu na neku vrstu krutog „nosača" (engl. carrier-free or carrier-bound). U slučaju korištenja nosača imobilizacija enzima se uspostavlja formiranjem kovalentnih veza ili nekovalentnih interakcija između aktiviranog nosača i enzima. Kovalentno vezivanje na više pozicija nosača (engl. multipoint) je metoda koja daje veću stabilizaciju imobiliziranog enzima.
Nosači koji su u vinarstvu najčešće u upotrebi su: hitosan, agaroza i silika.
Enzimi mogu također biti imobilizirani ako se uklope u poroznu matricu različitih materijala pretežito polimera, među kojima je polivinil alkohol (PVA) dosta interesantan jer posjeduje više korisnih značajki.
Imobilizacija koja ne uključuje vezivanje na nosač, može sadržati enzimski sklop koji je povezan, umrežen u enzimski agregat. Ovakav oblik imobilizacije je dosta privlačan jer ga je lako prirediti.

Najčešći materijali koji se koriste kao umreživači za enzimske agregate (engl. CLEA – cross linked enzyme agregates) su: glutaraldehid, dekstran-aldehid i PEI/karbodiimid (polietilenimin karbodiimid). Među njima, u vinarstvu, glutaraldehid se najčešće koristi jer je komercijalno dostupan, cijena mu je niska, a vrlo je reaktivan. Najvažnije prednosti umreženih enzimskih agregata su njihova specifična usmjerena djelovanja, stabilnost, niska cijena i mogućnost ponovne upotrebljivosti.
Slična strategija koristi kompleksne multienzimske umrežene agregate, nastale vezivanjem nekoliko enzima unutar jednog katalitičkog agregata (engl. Combi CLEA). Kombinirani multienzimski umreženi agregati su korisni pri sekvencijskim ili kaskadnim biokatalitičkim procesima jer se enzimi zadržavaju u ograničenom prostoru i blisko su međusobno razmješteni.
Imobilizacija enzima je strategija kojom se u biotehnološkim procesima zadržava višekratna ponovljiva-obnovljiva katalitička funkcija enzima.

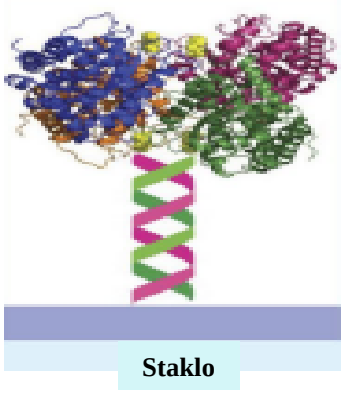
Koimobilizacija enzima (detaljnije – Poglavlje 9.3.2.)

Koimobilizacija enzima je svakako puno kompleksnija nego imobilizacija pojedinačnih enzima pa je to razlog zašto je razvoj tih klasa biokatalizatora tek nedavno postao predmetom imobilizacijskog inženjeringa.
Može se reći da koimobilizacija donosi bitno novije mogućnosti: reakcije s koimobiliziranim enzimima omogućuju regeneraciju enzima, moguće je izdvajanje produkata iz medija čija je dalja pretvorba podložna inhibiranju i moguća je primjena u kaskadnim reakcijama. Koimobilizacija enzima zahtjeva odgovarajuće imobilizacijske procedure počevši od promišljanja i selekcije nosača, razmatranja mehanizma imobilizacije i kinetike reakcija koje će se katalizirati.

Poželjno je da se efikasnost enzima ne ugrožava procesom koimobilizacije, a da se stabilnost koimobiliziranih enzima čak poveća. Koimobilizacija u varijanti bez nosača pokazala je dobar potencijal za primjenu u vinarstvu.
U toj varijanti enzimski katalizatori ne zahtijevaju prethodno pročišćavanje enzima priređenih za komercijalne preparacije, što bitno smanjuje troškove proizvodnje imobiliziranih enzima.
Kombi-umreženi enzimski agregati (engl. Combi CLEA), nastaju koimobilizacijom agregata nastalog precipitacijom proteina i njegovim umrežavanjem s reaktivnom komponentom. Takva koimobilizacija se pokazala kao obećavajuća strategija mobiliziranja komercijalnih enzimskih preparacija koji sadrže više vrsta enzima. Ove se preparacije (na pr. gel perle alginata i hitosana) mogu obnoviti i biti ponovno korištene nakon centrifugiranja ili taloženja, osim u slučajevima kada su čestice agregata manje od 10 mikrona.
Alternativne varijante za pripravu robusnijih i lako manipulirajućih enzima su kapsuliranje (engl. encapsulation) agregata ili naknadna dodatna imobilizacija agregata na krutom nosaču.
Kod imobilizacije kombi-umreženih enzimskih agregata na nosače treba razmotriti mehaničku otpornost agregata jer bi prilikom korištenja brzohodnih miješalica ili povećanih kompresija moglo doći do njihovog oštećenja.

Više različitih metoda koristi se za imobilizaciju i koimobilizaciju enzima, u praksi provjereno korisnih vinarstvu: enzimi ugrađeni u alginat, enzimi vezani fizičkom adsorpcijom na anionske smole ili na „nosač“ (nosivu podlogu) kovalentno vezani enzimi. Pri tome nosač može biti i porozno staklo ili najlon, Prikaz 9.6.

Prikaz 9.6. Enzim vezan na nosač – staklo.



Preuzeto iz: Rong Ye et al. (2018).

9.4.1. Temeljne značajke imobiliziranih enzima korisnih za vinarstvo

Prednosti korištenja imobiliziranih enzima u vinarstvu proizlaze iz posebnosti njihovih biokatilitičkih djelovanja (složenih specifičnih mehanizama):

• Bolja kontrola reakcija. U momentu u kojem je postignut maksimalni prinos produkta reakcija može biti brzo zaustavljena, a enzim uklonjen iz procesa.
Dobar primjer je reakcija hidrolize glikoziliranih terpena u mladom vinu jer je poželjno da se dio aroma sačuva i biva otpušten tek u fazi dozrijevanja vina ili nakon buteljiranja. Stoga bi bilo poželjno da samo ograničena koncentracija terpena bude otpuštena tijekom vinifikacije.
• Bolja stabilnost enzima. Ova značajka imobiliziranih enzima je jedna od bitnih. Tijekom različitih faza procesa vinifikacije mijenjaju se uvjeti pod kojima enzimi djeluju (sadržaj etanola, temperatura i kiselost (pH)) te oni za njihovu djelotvornost mogu postati problematični. Stabilizacija enzima njihovim kapsuliranjem (ugradnjom), u višeslojnu strukturu, omogućuje fazno optimiranje djelovanja pojedinih enzima pod progresivno promjenljivim procesnim uvjetima.
• Olakšana kontrola doziranja. Viša koncentracija–doza enzima može biti dodana ako je potrebno kompenzirati inhibicijski efekt koji izazivaju: sumporov dioksid, fenoli i tanini, a da se pri tome ne mijenjaju značajke produkta katalize.
• Produkti su oslobođeni katalizatora. Pri korištenju imobiliziranih enzima nije potrebna posebna inaktivacija i odvajanje enzima-proteina od produkata nastalih katalizom. Na primjer, ako se koristi imobilizirani lizozim lako ga je otkloniti iz medija, bez bojazni od alergijskih reakcija koje bi mogao naknadno prouzročiti.
• Primjena pri kontinuiranoj vinifikaciji. Imobilizacija enzima omogućuje provođenje kontinuiranih procesa vinifikacije što je prednost pred konvencionalnom tehnologijom šaržnog postupka. Isti pristup omogućuje i primjenu pri visoko automatiziranim procesima.

Mnoga istraživanja koja su vezana na korištenje imobiliziranih enzima u vinarstvu usmjerena su na strategiju vezivanja enzima na nosače. Pri tome se od nosača posebice ističu polimerne perle bazirane na biorazgradivim polimerima, poput alginata i hitosana. Neki od komercijalno dostupnih materijala koriste i akrilne polimere. Hitosan i alginat su netoksični, jeftini i dostupni u različitim formama (praškasti, gel, vlakna i membrane). Zbog toga su posebice pogodni za imobilizaciju enzima koji se koriste u prehrambenoj industriji.
Imobilizacija višestrukim kovalentnim vezivanjem osigurava izrazitu stabilizaciju i očuvanje enzima, a to omogućuje uporabu u kontinuiranim procesima i produkte oslobođene katalizatora, što je vrlo svrsishodno u vinarstvu.

Iako je razvidno da imobilizacija enzima ima mnogo prednosti, ipak njihova primjena u vinarstvu nije uvijek moguća i stoga treba imati na umu da je korištenje slobodnih formi topljivih enzima često optimalna varijanta biokatalize, na primjer pektinaze, celulaze i hemicelulaze u funkciji pektolitičkih enzima.

U nastavku su navedeni slučajevi u vinarstvu u kojima bi se moglo ili trebalo razmotriti potencijale korištenja imobiliziranih enzima.

9.4.2. Dodavanje imobiliziranih enzima u fazi maceracije

Pektinaze, celulaze i hemicelulaze se dodaju u mošt tijekom maceracije i preporuka je dodati ih u slobodnoj, neimobiliziranoj, topljivoj formi. Slobodna, nevezana forma je aktivna na granici faza kruto/tekuće (tkiva bobice/mošt), a to osigurava efikasnu interakciju makromolekularnog supstrata (na pr. celuloze i pektina) s aktivnim katalitičkim središtem u strukturi enzima.
Takva interakcija je efikasnija u odnosu na složeniji mehanizam djelovanja imobiliziranih enzima. Imobilizirana pektinaza ipak ima ulogu ako se koristi u fazi bistrenja vina.

U fazi maceracije interesantnim se pokazalo korištenje imobiliziranih glukoza oksidoreduktaza (engl. GOX). GOX katalizira oksidaciju glukoze, smanjujući sadržaj šećera, a time indirektno i etanola koji nastaje u procesu fermentacije. To je pogodno u slučajevima kada se cilja da vino kao konačni produkt sadrži manje alkohola. Kapsulacijom GOX-a u unutarnji prostor alginatne perle dobiva se aktivni biokatalizator koji je prilagođen kiselosti (pH) mošta. Slobodna forma GOX-a djeluje efikasno na redukciju količine glukoze samo u bazičnim uvjetima. Perle su strukturirane na način da je njihova šuplja unutrašnjost, koja sadrži medij drugačije vrijednosti pH od mošta, obavijena polupropusnim slojem. Obično je kiselost unutar tako imobiliziranog enzima bliža vrijednosti pH pri kojima su enzimi efikasniji, manje je kisela.

9.4.3. Dodavanje imobiliziranih enzima u fazi fermentacije

Uzevši u obzir uvjete pod kojima se odvija fermentacija, biokatalizatori koji su prihvatljivi u ovoj fazi vinifikacije moraju prvenstveno imati termičku stabilnost i zadržati aktivnost pri različitim vrijednostima pH i pri različitim koncentracijama etanola.

Različiti imobilizacijski pristupi prvenstveno uključuju imobilizaciju ß-glukozidaza, koje po svojoj funkciji potiču oslobađanje spojeva koji povećavaju aromatičnost vina. Više vrsta nosača je pogodno za imobilizaciju ß-glukozidaza.
Najbolji rezultati su postignuti imobilizacijom na sol-gel mikročesticama, s polivinil alkoholom (PVA) kao nosačem, a hidroliza glukozida terpena vrlo je uspješna i pri korištenju glukozidaza vezanih na hitosan čestice.
Uspoređivanjem efikasnosti, utvrđena je razlika u djelovanju slobodnih i imobiliziranih formi ß-glukozidaza na glukozide primarnih i tercijarnih alkohola, predšasnike aroma.
U slučaju korištenja slobodnih enzima najjače je djelovanje bilo na linalol, oslobođen iz glukozidnih struktura tercijarnih alkohola.

Pri korištenju imobiliziranih formi glukozidaza najjača djelotvornost je bila usmjerena prema nerolu i geraniolu, nastalih djelovanjem na glukozidne strukture primarnih alkohola.

Traženje optimalnih formi imobiliziranih glukozidaza iniciralo je niz eksperimentalnih i praktičnih pristupa, među kojima se ističu primjene više vrsta nosača od kojih su najčešći:

• umreženi enzimski agregat — komercijalna preparacija Rapidase AR 2000 (DSM co.)
• hitosan — komercijalna preparacija Cytolase PCL5 (DSM co.)
• epoksi aktivirane akrilne perle — Euperit C (Rhon Darmstat)
• polivinil alkohol magnetične čestice
• kombi-umreženi enzimski agregat (engl. combi-CLEA) — koimobilizacija agregata nastalog precipitacijom proteina i umrežavanja s difunkcionalnim reagensom.

Imobilzacija glukozidaza omogućuje bolju kontrolu katalitičkih procesa: uključivo bolju kontrolu multienzimskih i kaskadnih procesa (kombi umreženi enzimski agregati), povećanje otpuštanja aroma (terpena), ali i sprečavanje djelovanja esteraza.

9.4.4. Dodavanje imobiliziranih enzima u fazi bistrenja mošta i vina

Tradicionalno se tehnologija bistrenja mošta i vina svodi na jednokratno dodavanje enzima. Iako pektinaze posjeduju izvrsna katalitička svojstva, ipak njihovo korištenje u formi slobodnih topljivih varijanti ima i loših strana. Prvenstveno je to varijabilnost u djelovanju pod promjenljivim uvjetima maceracije i vinifikacije, a i njihova ponovna upotrebljivost nije moguća. Procesna stabilnost i ponovljiva upotrebljivost moguća je ako se koriste imobilizirane pektinaze. Široka je paleta nosača koji se mogu koristiti za imobilizaciju pektinaza (esteraza) i poligalakturonaza (hidrolaza), sa svrhom njihovog korištenja u procesima bistrenja i depektinizacije. Neke od tih imobiliziranih preparacija pektinaza ili poligalkturonaza su komercijalne preparacije pojedinih kompanija (bez preciziranog sadržaja vrsta i udjela enzima), a neke su preparacije dobivene iz gljivica i bakterija.
Kao nosači se koriste:
• alginat — (komercijalne pektinolitičke preparacije: Rapidase C80 (Gist Brocades, Delft, The Netherlands), Biopectinase CCM (Quest International, Naarden, The Netherlands), Grindamyl 3PA (Danisco, Copenhagen, Denmark) i Pectinex 3XL (Novozymes, Copenhagen, Denmark)).
• PVA (polivinil alkohol) — (komercijalne pektinolitičke preparacije: Pectinex UltraColor and Pectinex BE XXL (Novozymes, Copenhagen, Denmark), Klerzyme 150 and Rapidase (DSM, Delft, The Netherlands), Panzym Smash XXL and Panzym YieldMASH (Begerow, Darmstadt, Germany)).
• umreženi enzimski agregat (CLEA) — (komercijalne pektinolitičke preparacije: Pectinex UltraSP-L, Pectinex Ultra Color, Pectinex Smash XXL, Novozym 33095, Pectinex Ultra Clear, Pectinex BE XXL (Novozymes, Copenhagen, Denmark)).
• aktivirani glikozil agar-gel — (komercijalne pektinolitičke preparacije)
• PVA — (pektinaze dobivene iz gljivica – *Aspergillus niger* NRC1ami)
• alginatna matrica–želatina/kalcij oksalat — (pektinaze iz gljivica – *Aspergillus niger* ATCC)
• čvrsta poliuretanska pjena — (pektinaze dobivene iz gljivica – *Aspergillus niger*, komercijalna preparacija Rohapect®DA6L (AB Enzymes, Darmstadt, Germany)).
• staklene mikrosfere, najlon 6/6 pelete, PAN perle - (pektinaze dobivene iz gljivica - *Aspergillus sp.* Macer8 FJ).
• epoksi aktivirani polimer Dilbead, Florsil i nano silika (aktivirana aldehidnim grupama) — (pektinaze dobivene iz gljivica – *Aspergillus aculeatus)*

• alginat, agar-agar i hitosan perle (aktivirane formaldehidom) — (pektinaze dobivene iz bakterija – *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21)
• alginat, poliakrilamid i agar-agar — (poligalakturonaze dobivene iz bakterija – *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21)
• silikom presvučen hitosan — (komercijalna preparacija poligalakturonaze – Fluka Chemical)

Preuzeto iz: Ottone et al. (2020).

Iz prethodnog navoda razvidno je da postoji više mogućnosti preparacija imobiliziranih pektinaza. Svaka od njih ima neke prednosti, ali i neke slabosti.

Neki od enzima imobilizirani su zarobljavanjem (bez kemijskog vezivanja) u polimernu matricu. U ovoj varijanti kao nosači služe prirodni spojevi, na primjer alginat, ili sintetski (primjer PVA). Prednost imobilizacije enzima u polimernu matricu je prije svega jednostavnost metode i mogućnost formiranja čestica uniformnih veličina. Međutim zbog velike poroznosti matrice i relativno malih molekula enzima može doći do curenja enzima iz nosača. Ispitivane su i metode imobilizacije pektinaza kovalentno vezanih na hitosan presvučen slojem silike. Ovakva imobilizacija rezultirala je povećanjem termičke otpornosti katalizatora, ali i optimalnu efikasnost u širokom rasponu vrijednosti pH, od 3,0 do 4,5. Imobilizacijom pektinaza na amino-siliku presvučenu magnetičnim nanočesticama postignuta je također otpornost u širem rasponu temperatura i vrijednosti pH, a dodatno i stabilnost u duljem periodu skladištenja, a i ponovljivost upotrebe je bila poboljšana. Korištenje metode imobilizacije na inertnom nosaču nosi određene probleme: dodatno povećanje troškova procesa imobilizacije, povećava se masa inertnih materijala, a opada specifično usmjerena efikasnost biokatalizatora.

Nasuprot navedenim problemima, pristupom u kojem se koriste umreženi enzimi (umreženi enzimski polimerni agregati) nastaju netopljive stabilne pektinaze čija preparacija je jednostavna, brza i ekonomična. Kombi-umreženi enzimski agregati (engl. Combi CLEA) priređeni koimobilizacijom agregata pektinaza i celulaza su, u odnosu na slobodne forme enzima, puno termički stabilniji (dva do tri puta), a mogu se i ponovno koristi (eksperimentalno potvrđena četverokratna iskoristivost). Koimobilizirani umreženi agregati pektinaza mogu smanjiti mutnoću mošta za više od 50 %.

Zaključno, korisna imobilizacija pektinaza mora pokazati: dobru biokatalitičku efikasnost, imati odgovarajuću veličinu pora kroz koje se može ostvariti difuzija visoko polimerne strukture pektina, biti stabilna pri procesnim uvjetima, a materijali koji se koriste moraju biti neškodljivi.

9.4.5. Dodavanje imobiliziranih enzima u fazi stabilizacije i dozrijevanje vina

Pojava mutnoća u bijelim vinima se u vinarijama često događa. Problem se prvenstveno detektira kao vizualni defekt, a okusne i mirisne značajke vina se pritom ne mijenjaju. Pojava mutnoća u toj fazi stabilizacije ne predstavlja ni zdravstveni rizik. Međutim potrošačima je ova mana vina neprihvatljiva.

Nastajanje mutnoća je uglavnom uzrokovano sporom denaturacijom enzima, koji mogu postati nestabilni tek naknadno, pri izlaganju već buteljiranih vina povišenim temperaturama, tijekom transporta ili skladištenja.

Dominantni proteini koji su uzročnicima pojave mutnoća vina su taumatin proteini (smjesa „slatkih“ proteina) i hitinaze, proteini nastali u fazi obrane biljke od napada patogena.

Još neke vrste proteina, koje su također nastale kao odgovor loze na napad patogena ili su bile formirane u fazi dozrijevanja grozda: ß-glukanaze, invertaze, proteini prenositelji lipida (engl. lipid transfer proteins) i proteini povezani s dozrijevanjem grožđa, također utječu na formiranje mutnoća, ali u manjoj mjeri. Tautamin klasa proteina je manje sklona induciranju mutnoća pri zagrijavanju. Neki od tautamina mogu čak reverzibilno, nakon prestanka zagrijavanja, ponovno prijeći u stabilnu formu. Hitinaze iskazuju ireverzibilno ponašanje, ostaju nepovratno u nestabilnoj denaturiranoj formi pa se time može objasniti veća sklonost hitinaza formiranju mutnoća. Neproteinski faktori koji utječu na formiranje mutnoće uključuju: polisaharide, sulfate i promjene kiselosti (pH). Utjecaj imaju i faktori koji povećavaju koncentraciju proteina u grožđu: strojna berba, dugotrajni transport grožđa, infekcije grožđa i klimatske promjene. Fenolni spojevi i sulfati potiču nastanak proteinskih agregata, a polisaharidi mogu ometati procese agregacije, ali ne i spriječiti ih. Male promjene u kiselosti (pH) mogu utjecati na topljivost proteina i povećati njihove interakcije s drugim makromolekulama. U većini bijelih vina koncentracija hitinaza je niža od koncentracije tautamina. To je vjerojatno posljedica strukturnih razlika, hitinaze su eliptične što ih čini puno osjetljivijim na promjene temperatura i pH. Tautamini imaju kuglastu strukturu, termostabilnu i manje osjetljivu na promjenu pH.

Tradicionalno su se bentoniti koristili za uklanjanje nestabilnih proteina. Međutim, njihova primjena je radno zahtjevna, uzrokuje gubitke vina (3 do 10 %), kvari kvalitetu vina i posljedično stvara ekološki neprihvatljiv otpad. Tretman bentonitima je relativno skupa metoda. Osim troškova samog bentonita, metodu poskupljuju troškovi rada, procesni troškovi i troškovi zbrinjavanja otpada.
Stoga je logično primijeniti efikasnije tehnologije enzimske stabilizacije kojima se problemi i dodatni troškovi izbjegavaju.

Imobilizacija proteaza

Za stabilizaciju bijelih vina preporučena je primjena komercijalnih preparata imobiliziranih kiselih proteaza (proteaza koje su specifično aktivne u kiselom mediju). Primjena slobodnih formi proteaza limitirana je zakonskim regulativama Europske unije, jer je među inim utvrđeno da njihova primjena u vinarstvu pokazuje nisku efikasnost i nisku stabilnost. Imobilizirane proteaze koje su se pokazale korisnim u vinarstvu, prvenstveno u funkciji kontrole stabilnosti proteina, kao nosače za imobilizaciju najčešće koriste: hitosan, akrilne i staklene perle.

U fazi stabilizacije korisno je spriječiti i djelovanje opasnih mikroorganizama, ali i eliminirati prisutnost štetnih kemijskih spojeva poput ureje.
Kao stabilizacijski korisne preparate preporuka je koristiti neke proteaze prirodnog porijekla: bromelin (smjesa proteaza), papain (cisteinska proteaza) i proteaze koje produciraju gljivice *Aspergillus saitoi*. Za zaštitu od mikroba preporuka je koristiti imobilizirani lizozim, a za eliminaciju ureje imobilizirana ureaza.

U Tablici 9.1. navedeni su imobilizirani enzimi korisni za stabilizaciju vina, uključivo proteaze, lizozim i ureaze. Navedeni su i komercijalni preparati i sojevi gljivica i bakterija iz kojih se ti enzimi mogu izdvojiti kao i nosači koji se koriste za njihovu imobilizaciju.

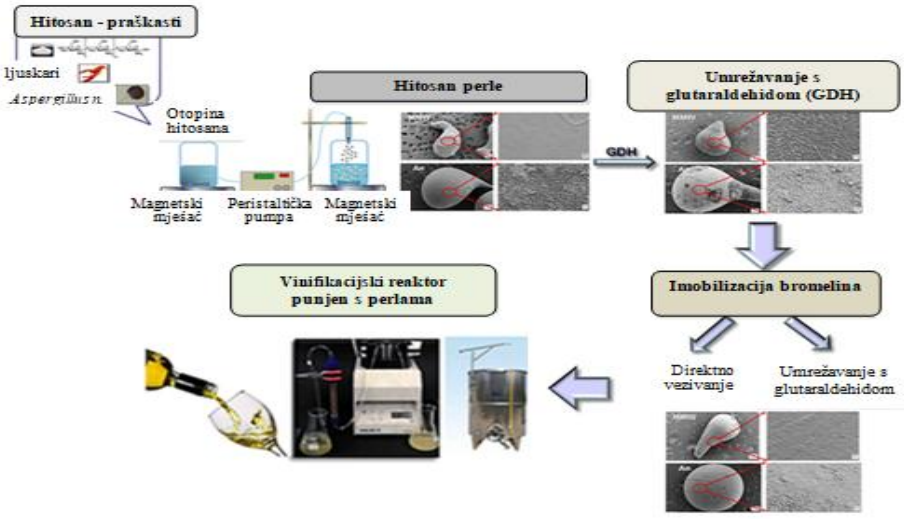
Tablica 9.1. Imobilizirani enzimi koji se mogu koristiti u fazi stabilizacije i starenja vina.

Primjena	**Enzim**	**Podrijetlo**	**Nosač**
Redukcija proteinskih mutnoća	bromelin (smjesa proteolitičkih enzima)	Prirodna biljna cisteinska proteaza (Sigma-Aldrich, USA)	hitosan perle
		Stabljika ananasa (Sigma-Aldrich, USA)	hitosan, staklene i akrilne perle
	papain (cisteinska proteaza)	Prirodna biljna cisteinska proteaza (Sigma-Aldrich, USA)	hitosan perle
	proteaza	*Aspergillus saitoi* (Sigma-Aldrich, USA)	staklene i akrilne perle
Kontrola mikroba	lizozim	bjelanjak kokošjih jaja	hitosan perle magnetične polistirenske mikročestice
		Micrococcus lysodeikticus (Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd.,China)	hitosan nanovlakna
Eliminacija ureje	ureaza	*Lactobacillus fermentum* (Nagase Europa GmbH, Germany)	hitosan perle akrilne perle

Preuzeto iz: Ottone et al. (2020).

Enzim bromelin (smjesa proteolitičkih enzima – cisteinska proteaza) imobiliziran na hitosan perlama pokazao je visoki stupanj redukcije mutnoće vina (skoro do 70 %), bez loših popratnih djelovanja. Bromelin je prirodna smjesa enzima, najčešće dobiven iz ploda (nedozrelog) i stabljike ananasa, koji osim više proteaza sadrži i fosfataze, glukozidaze, peroksidaze, celulaze i glikoprotein.
Pokazalo se da imobilizirani bromelin, u odnosu na ponašanje slobodnih enzima, pokazuje veliku rezistenciju na u vinu prisutne inhibitore (etanol, SO_2, tanine).
Bromelin pokazuje i dobru efikasnost imobiliziranjem direktno na hitosan perle, ali i umrežavanjem s glutaraldehidom.

Prikaz 9.7. ilustracija je procesa imobilizacije bromelina. Iako je korištenje imobilizacije bromelina na hitosan nosaču dalo vrlo dobre rezultate, pokazalo se da postoji još dosta prostora za unapređenje primjene tako imobiliziranog bromelina.



Prikaz 9.7. Imobilizacija bromelina na hitosan perle (direktno vezivanje) ili umrežavanjem s glutaraldehidom.
Preuzeto iz: https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0268005X16302132-fx1_lrg.jpg

Proteaze imobilizirane multipozicijski kovalentnim vezivanjem na gliokzil agarozu pokazale su, u odnosu na imobilizirani bromelin, još bolje rezultate, prvenstveno veću stabilnost.

Imobilizacija lizozima

Lizozim je enzim koji se pokazao kao vrlo uspješna antimikrobna alternativa korištenju sumporovog dioksida u funkciji kontrole bakterija jabučno-mliječnog vrenja. Kako su za kontrolu tog vrenja potrebne visoke doze lizozima, mora se razmotriti i moguća pojava alergijskih reakcija ako taj enzim zaostane u vinu u prevelikoj koncentraciji. Problem može biti riješen imobilizacijom lizozima. Lizozim koji je kovalentno vezan na nosač može se efikasno odstraniti iz vina. Imobilizacija kovalentnim vezivanjem je preferirana tehnologija, kao što je to i s drugim enzima koji se koriste u vinifikacijskim procesima. Lizozim imobiliziran na hitosanu testiran je u različitim sortama bijelih vina. Zbog steričkog ometanja nastalog pri kovalentnom vezivanju enzima na nosač pokazalo se da je efikasnost imobiliziranog lizozima dosta niža u usporedbi s djelovanjem slobodne forme enzima.
Međutim, antimikrobno djelovanje imobiliziranog lizozima nije bilo ugroženo prisutnošću SO_2 i ukupnih fenola u mjeri u kojoj ti spojevi inhibiraju djelovanje slobodne forme lizozima. Ovakvo pozitivno usporedno ponašanje je posebice bilo naglašeno pri djelovanju imobiliziranog lizozima na crna vina, u kojima su prirodno prisutne više koncentracije fenola.

Imobilizirani lizozim je pokazao puno manju osjetljivost na inhibiranje fenolima. Imobilizacija lizozima i u drugim varijantama: na primjer kovalentnim vezivanjem na neporozne polistirenske čestice ili primjenom magnetičnih mikročestica, pokazala je razlike u kinetici biokatalitičkih reakcija. Sve forme imobiliziranih lizozima pokazale su nižu efikasnost, u usporedbi sa slobodnom formom enzima, prvenstveno zbog steričke ometenosti i smanjene difuzije enzima iz vezanih ili kapsuliranih formi. Stoga je traženje efikasne forme imobilizacije lizozima jedan od razvojnih izazova koji stoji pred biotehnolozima.

Imobilizacija ureaze

Ureaze u imobiliziranoj formi su dosta prisutne u industriji fermentirane hrane i pića i tu imaju temeljnu funkciju odstranjivanja ureje. Iako je enzimska hidroliza ureje, koja rezultira nastajanjem ugljikovog dioksida i amonijaka, interesantna ideja za onemogućavanje stvaranja nepoželjnih karbamata, taj je pristup slabo prihvaćen u vinarstvu.
Efikasnost tretmana jako ovisi o sadržaju inhibitora u pojedinim vrstama vina. Alternativa kojom se izbjegava inhibicija je imobilizacija ureaze. Imobilizirani enzim na hitosanskom nosaču je puno manje osjetljiv na inhibiranje koje uzrokuju tanini ekstrahirani iz sjemenki grožđa. Topljive komercijalne varijante ureaze se moraju dodavati u vrlo visokim koncentracijama, a i tada je učinak degradacije slab. Imobilizirana ureaza je alternativno rješenje koje ubrzava proces eliminiranja ureje, izbjegava se problem visokih koncentracija enzima, a zbog netopljivosti biokatalizatora lako ga se uklanja iz vina.

9.4.6. Usporedba metoda za stabilizaciju vina

Stabilizacija proteina, uzročnika mutnoće vina, pretežito se temelji na novijim tehnologijama koje su efikasnije i ekološki podobnije. Pri tom se koriste obnovljivi materijali čijom se primjenom smanjuju i procesni gubici vina. Jedan dio metoda razvijenih za stabilizaciju proteina temelji se primjeni kombinacije fizikalno-enzimskih tretmana, imobiliziranih formi enzima i primjeni vezivanja na površine materijala izraženih adsorpcijskih svojstava. Drugi dio uključuje primjenu posebno razvijenih dodataka na bazi: manoproteina, hitosana i karagenana.
Postoje ključne pretpostavke koje pri korištenju svake od metoda treba analizirati i vrednovati: (1) dolazi li do otpuštanja bilo kojeg neželjenog spoja tijekom tretmana,(2) da li su troškovi regeneracije visoki, (3) generira li se otpadni materijal,

(4) da li je materijal koji se koristi u tretmanu višekratno upotrebljiv i (5) da li tretman utječe na kvalitetu osjetilnih značajki vina?
Primjena pojedinih metoda stabilizacije proteina, koje ne zahtijevaju posebne dodatke, zbirno je opisana u Tablici 9.2. U tablici su uspoređene stabilizacijske metode, procesni uvjeti (kada, koliko i pri kojoj temperaturi se koristi metoda i materijali za stabilizaciju) i kolika je očekivana redukcija proteina izražena postotno.

Tablica 9.2. Pristupi i metode stabilizacije proteina, bijelih vina.

Stabilizacijska metoda		**Kada?**	**Doziranje**	**Redukcija proteina**
Unaprjeđena tradicionalna metoda	**Bentoniti**	TF	1,6-1,8 g/l	—
		NF	2-3 g/l	67-95 %
Kombinirani tretmani **fizikalno /enzimski**	**Tretman ultrazvukom**	NF	30 %/5-10 min, 60-90 %/10 min	—
	Toplina + enzimi	PF	75 ºC/1 min + 15 mg/l enzimi	80-84 %
		NF	75 ºC/2 min + 2 ml/l enzimi	80-90 %
	Ultrafiltracija	NF	?	—
	Ultrafiltracija + toplina + enzimi	NF	62 ºC /10 min + 30 mg/l enzimi	30-96 %
	Imobilizirani enzimi na hitosanu	NF	106-260 g/l	61-63 %
Adsorpcijski tretmani	**Magnetične nanočestice + akrilna kiselina**	NF	?	> 90 %
	Zeoliti	NF	4-8 g/l – 1-3 sata	> 90 %
	Tostirani prah sjemenki grožđa	PF	5-15 g/l – 1 sat	37-85 %
		NF	25-32 g/l – 1 sat	90-98 %
	Cirkonij	TF	25 g/l – 72-192 sati	> 70 %
		NF	3,3-5,7 g/l – 30 min	do 42 %

Napomene: Tretmani — kada? (PF – prije fermentacije, TF – tijekom fermentacije, NF – nakon fermentacije), doziranje (kada, koliko, temperatura) i očekivana redukcija proteina (%).

Preuzeto iz: Silva-Barbieri et al. (2022).

Kombinacije termičko/kemijskih tretmana i **adsorbirajući materijali:**

• Po OIV legislativi dozvoljeno je korištenje procesa u kojem se kombinira dodavanje enzima uz dodatno kontrolirano zagrijavanje medija. Pri korištenju metode koja uključuje zagrijavanje vina i dodavanje enzima potrebno je razmotriti prikladnost tretmana za pojedine vrste vina, jer kriva procedura može vino pretvoriti u nešto što se ne može piti.
• Tretman ultrazvukom i visoko tlačna ultrafiltracija su tehnologije za stabilizaciju proteina koja još trebaju provjeru, u kojoj mjeri su korisne, a u kojoj mjeri imaju ograničavajuće efekte, ali i koje su mogućnosti njihovih primjena u procesima vinifikacije pri masivnoj industrijskoj proizvodnji.
•Imobilizirani enzimi na hitosanu kao nosaču su jedan od primjera metode velikog potencijala, ali je potrebno unaprijediti regeneraciju tih materijala. Ova metoda znatno poboljšava imobilizacijske enzimske značajke, uspješna je ne samo u slučaju korištenja hitosana kao nosača, koji je ekološki vrlo prihvatljiv, već i varijanti korištenja nanokompozita, smjese hitosana i mikročestica gline.

•Primjena akril/magnetičnih nanočestica je jedan od najviše obećavjućih tretmana, ali još uvijek postoje mogućnosti unapređenja ovog tretmana. Potrebno je preciznije utvrditi dolazi li do otpuštanja akrilne kiseline ili magnetičnih komponenti u vino.
Treba provjeriti i da li materijal koji se koristi za ispiranje imobiliziranog materijala može prodrijeti u strukturu nosača i posljedično prijeći u vino. Dodatno ovu tehnologiju treba unaprijediti jer se pri regeneraciji–ispiranju producira puno otpadnog materijala.
•Tretman zeolitima daje dobre katalitičke značajke, ali zbog otpuštanja u medij komponenti koje mogu biti štetne po zdravlje ili prelaze koncentracije dozvoljene OIV propisima metoda je upitna. Stoga su potrebna daljnja istraživanja o primjenljivost ovog tretmana. Jedna od prednosti ove metode je mogućnost naknadne primjene otpadnih materijala u poljoprivredi.
•Od obećavajućih tehnologija svakako treba spomenuti i korištenje tostiranog praha sjemenki grožđa (10 minuta/180 ºC), jer se time u proces vraća materijal koji se tretira kao otpad u procesu vinifikacije. Nažalost, za sada, se u slučaju dodavanja tog praha u šaržnoj varijanti vinifikacije javljaju gubici vina (3 do 10 %), koji su usporedivi s gubicima pri primjeni bentonita. Dodatno, procesni parametri (vrijeme dodavanja i doziranje) moraju biti prilagođeni vinifikacijskoj fazi. Dodati tostirani prah prije, tijekom ili nakon fermentacije?
•Kontinuirani procesi u kojima se koristi cirkonij efikasno stabiliziraju bijela vina kroz smanjenje koncentracije ukupnih proteina. Međutim zbog visoke cijene ovih materijala treba ozbiljno razmotriti mogućnost njihove primjene u industrijskim vinifikacijskim procesima.

Posebni dodaci

Smanjenje mutnoće ili magličavosti vina se može postići i dodavanjem posebnih aditiva priređenih razgradnjom i ekstrakcijom iz mikroorganizama ili biljki. Primjena ovih dodataka je sve popularnija i uspješnija i uključuje: manoproteine, hitosan i karagenan. Metode u kojima se koriste ovi materijali smanjuju sadržaj neželjenih proteina, a istovremeno se ne narušava kvaliteta osjetilnih značajki vina.
OIV dozvoljava dodavanje u vino manoproteina, koji nastaju razgradnjom staničnih membrana kvasaca, i hitosana gljivičnog podrijetla.

Manoproteini

Manoproteini su polisaharidi staničnih membrana kvasaca, visoko glikozilirani proteini koji sadrže 1 do 10 % proteina i 85 do 90 % ugljikohidrata (pretežito manoze). Manoproteini se otpuštaju tijekom fermentacije i starenja vina i mogu se iz medija odvojiti raznim metodama ekstrakcije. Njihova efikasnost, kao aditiva, ovisi o podlozi iz koje su ekstrahirani i o metodi kojom su izdvojeni.
Obično se ekstrahiraju iz kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, ali mogu biti ekstrahirani i iz drugih vrsta kvasaca.

Kvasci sojeva *Schizosaccharomyces japonicus* mogu tijekom fermentacije na odgovarajućoj podlozi otpustiti do 7 puta više manoproteina nego komercijalni sojevi *Saccharomyces cerevisiae*. Komercijalni manoproteini dodani u preporučenim dozama osiguravaju termički stabilnija vina, a analiza osjetilnih značajki pokazuje da su dobivena vina puno kvalitetnija ako se usporede s onima tretiranim s bentonitima. Komparacijom djelovanja manoproteina i enzima ß-glukanaza, u bijelim vinima, pokazano je da manoproteini produciraju vina koja su skoro dvostruko stabilnija od onih tretiranih ß-glukanazom. Manoproteini povećavaju stabilnost proteina u bijelim i roze vinima.

Hitin/hitosan

Hitin i njegov derivat hitosan su polisaharidi koji selektivno eliminiraju proteine hitinaze, koji su nastali kao posljedica reakcije loze na djelovanje patogena.
Hitin je dugolančani polimer N-acetilglukozamina, amidnog derivata glukoze. Po zastupljenosti je drugi polisahrid u prirodi, poslije celuloze. Primarni je sastojak staničnih stijenki gljiva i egzoskeleta člankonožaca (insekata, rakova itd.).
Hitosan je linearni polisaharid, po sastavu nasumično raspoređenih β-povezanih D-glukozamina i N-acetyl-D-glukozamina. Komercijalno se proizvodi deacetilacijom hitina. Hitosan preparati, korisni vinarstvu, su uglavnom spojevi koji se dobivaju iz gljivica *Aspergillus niger*. Ovi polisaharidi se mogu također vezati s fenolnim spojevima i organskim kiselinama i time spriječiti neželjene promjene boje i teksture vina. Djelovanje hitosana je usmjereno i prema smanjenju koncentracije teških metala (željeza, olova, kadmija i bakra), sprečavajući takozvane pojave loma (željezo, bakar), smanjenje druge vrste kontaminacije i zagađenja koje mogu uzrokovati razni patogeni mikroorganizmi (npr. *Brettanomyces* kvasci).

Karagenan

Karagenan je visoko molekularni polisaharid koji sadrži disaharide galaktopiranoze, a dobiva se ekstrakcijom iz crvenih algi. Za sada OIV ne spominje korištenje karagenana, iako je eksperimentalno dao vrlo dobre rezultate. Prije odobrenja za korištenje i komercijalizaciju karagenana i sličnih pripravaka potrebno je još provjeriti: prisutnost iona metala, sklonost nastajanju taloga ili ostataka koji mogu ugroziti procese vinifikacije, na primjer filtriranje. Karagenan ekstrahiran iz algi ima više strukturnih varijanti, kapa dolazi u formi čvrstog gela, jota je elastičan gel, a lambda nema gel strukturu i uglavnom se koristi kao ugušćivač. Ispitivanja su pokazala da dodavanje niskih koncentracija karagenana lambda strukture, 125 do 250 g/l, tijekom fermentacije ili 125 g/l u već odvrelo vino ima za posljedicu veću termičku stabilnost i smanjenje sadržaja proteina za 75 do 90 %. Čak štoviše, dodavanje karagenana ne mijenja kemijski sastav vina i nema utjecaj na osjetilne značajke, u usporedbi s tretmanom bentonitima.

No, nađeno je da se javljaju i negativni učinci pri tretmanu s karagenanom, pojavljuju se problemi s njegovim ostacima pri filtriranju. Koncentracija neželjenih iona metala je upitna i varira sa strukturnom formom i prirodnim izvorom – algama.

9.4.7. Vrednovanje metoda za stabilizaciju proteina

Neke od tehnologija kojima se postiže stabilizacija proteina nastale su kao traženje direktne alternative za korištenje bentonita, a neke su proizašle iz razmatranja mehanizama djelovanja proteina uzročnika nestabilnosti i traženja kako osigurati njihovu stabilnost ili kako eliminirati njihovu prisutnost.

Usporedba tehnologija i usporedno vrednovanje metoda za stabilizaciju vina dana je u Tablici 9.3. Opisane su prednosti i ograničenja pojedinih pristupa, polazeći od značajki usporedivih s djelovanjem bentonita. Parametri koji su služili za vrednovanje svake metode bili su: troškovi metode, ekološka prihvatljivost, podobnost za industrijsku primjenu, utjecaj na kvalitetu vina i potrebni vremenski interval, pri korištenju pojedine metode.

Tablica 9.3. Usporedba metoda za stabilizaciju vina.

(+ povećanje, o smanjenje)

Metoda stabilizacije	Trošak metode	Ekološka prihvatljivost	Industrijska primjena	Kvaliteta vina	Vrijeme do tržišta
bentoniti	+++ oo	+ oooo	+++++	+ oooo	+++++
ultrazvuk	+++ oo	+++ oo	+ oooo	++ ooo	++++ o
ultrafiltracija	+++ oo	++ ooo	++++ o	+ oooo	++++ o
enzimi + zagrijavanje	++ ooo	++ ooo	+ oooo	++ ooo	+++ oo
enzimi imobilizirani na hitosanu	++ ooo	+++ oo	++ ooo	+++ oo	+++ oo
magnetične nanočestice/akrilna kiselina	+++ oo	++ ooo	+ oooo	+++ oo	++ ooo
zeoliti	++ ooo	++++ o	++ ooo	++ ooo	+++ oo
tostirani prah grožđanih sjemenki	++ ooo	+++ oo	+++ oo	+++ oo	++++ o
cirkonij	+++ oo	++++ o	+++ oo	+++ oo	+++ oo
Posebni dodaci					
manoproteini	+++ oo	+++ oo	++++ o	++++ o	++++ o
karagenan	+++ oo	+++ oo	++++ o	+++ oo	+++ oo
hitosan	+++ oo	+++ oo	++++ o	++++ o	++++ o

Preuzeto iz: Silva-Barbieri et al. (2022).

9.4.8. Usporedna tablica tradicionalnih i modernih biokatalizatora

Tablica razlika učinkovitosti i prednosti između tradicionalnih i modernih enzimskih sustava.

Kriterij usporedbe	Tradicionalni enološki enzimi	Nova generacija biokatalizatora
Čistoća i sporedni efekti	Često su sirovi ekstrakti s popratnim efektima (npr. cinamil-esteraza koja kvari aromu).	Visoko pročišćeni preparati dobiveni preciznom fermentacijom; bez nusefekata.
Specifičnost i selektivnost	Širok spektar djelovanja, djelomično neselektivno cijepanje polimera u moštu.	Izrazito ciljana specifičnost veza (supstrat-specifični); potpuno očuvanje strukture sortnih aroma.
Stabilnost u uvjetima rada	Osjetljivi na fluktuacije pH vrijednosti, višu koncentraciju SO2 i temperature.	Inženjerski optimizirani za visoku aktivnost pri niskom pH, povišenom alkoholu i prisutnosti SO2.
Tehnološki aspekt (Primjena)	Jednokratno doziranje u mošt/vino, ostaju trajno u sustavu (zahtijevaju bentonit za uklanjanje).	Mogućnost korištenja imobiliziranih enzima u reaktorima; lakše uklanjanje bez kvarenja proteina.
Utjecaj na filtrabilnost	Djelomična razgradnja pektina; smanjena učinkovitost kod Botrytis sirovine.	Učinkovita i brza degradacija botritičnih beta-glukana; dramatično olakšana filtracija.
Ekološko-ekonomski aspekt	Jeftinija inicijalna cijena, ali veći gubici kroz korekcije mana vina i bentonit.	Veća inicijalna investicija, ali znatne uštede kroz veći prinos samotoka i smanjenje doza SO2.

10. Rezime primjene enoloških enzima

Vinarstvo koristi široku paletu enzima koji se u slobodnoj formi dodaju u macerat, mošt i vino. Enzimi se koriste za poboljšanje više procesnih faza vinifikacije. Pektinaze, celulaze hemicelulaze i glikozidaze se ističu u procesima maceracije, bistrenja, taloženja i oslobađanja aroma. Glukanaze imaju ključnu ulogu u fazi dozrijevanja i bistrenja vina. Proteaze su efikasne u prevenciji mutnoće proteinskog porijekla. Svi ovi enzimi efikasno djeluju pri promjenljivim uvjetima vinifikacije, termičkim, kemijskim i mehaničkim, osiguravajući stabilnost i ekonomičnost vinifikacijskih procesa.
Lizozim se koristi u kontroli jabučno/mliječnog vrenja i sprečavanju neželjenog djelovanja bakterija mliječno kiselog vrenja. Ureaze, iako upitne iskoristivosti u vinarstvu, omogućuju degradaciju ureje i sprečavaju nastajanje nepoželjnih karbamata.

Razvoj novih klasa enzima i novih tehnologija za pripravu enzimskih preparata, koji se u vinarstvu koriste kao procesni katalizatori, posebice imobiliziranih i koimobiliziranih enzima nude vrlo obećavajuću budućnost.
Potencijal korištenja imobiliziranih enzima u vinarstvu predmetom je mnogih novih ispitivanja, eksperimentalnih i industrijskih. Imobilizacija omogućuje: bolju katalitičku stabilnost, katalizatori se mogu reciklirati i nastaju produkti koji ne sadrže katalizatore. Koimobilizacija enzima, već prisutna u vidu komercijalnih preparata, je strategija kojom se bitno mijenja pristup biokatalizi. Stvoreni su robusni katalizatori, korisne namjene za različite procesne faze vinifikacije, koji omogućuju vođenje kaskadnih reakcija, omogućuju višekratno korištenje, osiguravaju optimiranje procesa uz smanjenje utroška enzima, a sve to bez upliva na kvalitetu vina.
Pri vođenju automatiziranih procesa proizvodnje vina kontrola enzimskih reakcija je unaprijeđena ako se koriste imobilizirani i koimobilizirani enzimi, u onim fazama procesa gdje je to podesno. Restrikcije uporabe imobiliziranih enzima ovise o uvjetima vođenja procesa, konfiguraciji reaktora, a bitan faktor je i upliv na cijenu i kvalitetu vina.
Bez obzira na vrlo očite prednosti korištenja imobiliziranih enzima, njihovo korištenje u tako sofisticiranom proizvodu kao što je vino još treba potvrdu benefita koje bi oni vinarstvu donijeli.

Vinari imaju ključnu ulogu u ocjeni uspješnosti primjene novih tehnologija i korištenja novih dodataka, koji mijenjaju procesnu dinamiku i doprinose poboljšanju kvalitete vina. Uvođenje novih tehnologija i novih materijala ovisi o prihvaćanju inovacija od strane pojedinih vinara, ali i od prihvaćanja promjena u nekim tradicionalno orijentiranim vinarskim regijama.
Inovativne promjene se moraju potvrditi u malom nisko budžetnom vinarstvu, ali i u industrijskim razmjerima, jer tek to osigurava da kvaliteta osjetilnih značajki i kemijska svojstva vina neće biti ugrožena i neće pretrpjeti neželjene promjene i da neće biti nepovoljnog djelovanja na ljudsko zdravlje.

11. Zaključna razmatranja

Primjena enzimskih preparata u suvremenoj enologiji odavno je nadišla okvire jednostavnog tehnološkog alata za ubrzavanje procesa i postala temeljni stup precizne i kontrolirane proizvodnje vina. Kroz analizu provedenu u ovome radu, jasno je vidljivo da integracija specifičnih enzimskih skupina u ključnim fazama vinifikacije – od primarne prerade i maceracije do završne stabilizacije – donosi mjerljive kvantitativne i kvalitativne prednosti. Povećanje prinosa samotoka, optimizacija ekstrakcije fenolnih spojeva i stabilizacija boje kod crnih vina, kao i ciljano oslobađanje sortnih aroma, izravno utječu na povećanje tržišne vrijednosti finalnog proizvoda uz smanjenje energetskih troškova i mehaničkih opterećenja na sirovinu.

Posebno važan segment rada, potaknut zahtjevima suvremene enološke struke i recenzentskim smjernicama, odnosi se na nezaobilazan zaokret prema novoj generaciji biokatalizatora. Prelazak s tradicionalnih, često grubih enzimskih ekstrakata na visoko specifične, pročišćene i imobilizirane enzimske sustave predstavlja tehnološku revoluciju u podrumarstvu. Eliminacijom neželjenih sporednih aktivnosti, poput djelovanja cinamil-esteraze koja degradira sortni profil vina, te uvođenjem stabilnijih biokatalizatora dobivenih preciznom fermentacijom, modernim se vinarima otvara mogućnost mikromenadžmenta biokemijskih procesa u moštu i vinu.

Konačno, u kontekstu sve strožih ekoloških standarda i izraženih klimatskih promjena koje izravno utječu na sastav grožđa (poput učestale pojave Botrytis cinerea ili narušenih omjera kiselina i šećera), nova generacija enzima nudi nužnu tehnološku fleksibilnost. Olakšavanjem filtracije problematičnih mošteva, ubrzavanjem autolize kvasaca u sur lie metodi te omogućavanjem kontrole malolaktične fermentacije uz pomoć lizozima, ovi sustavi izravno pridonose smanjenju upotrebe sumporovog dioksida (SO_2). Moderno vinarstvo stoga ne može promatrati enzime kao aditive koji narušavaju prirodnost procesa, već kao ključne biotehnološke partnere u očuvanju autentičnosti, stabilnosti i vrhunske kvalitete vina.

Razvidno je da su već danas, a sutra neizostavno, enzimi novih generacija postali nužni element razumijevanja i upravljanja biokemijskim procesima, a ni vinarstvo tu nije iznimka.

11. Izvornici

1. **Ananga A**., Georgiev V., Ochieng J., Phills B. and Tsolova V. (2013) Production of Anthocyanins in Grape Cell Cultures: A Potential Source of Raw Material for Pharmaceutical, Food, and Cosmetic Industries, Poljuha D. and Sladonja B. (eds.) The Mediterranean Genetic Code – Grapevine and Olive, IntechOpen, London. doi:10.5772/54592

2. **Andlar M**., , Rezić T., Marđetko N., Kracher D., Ludwig R. and Šantek B. (2018) Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation, Engineering in Life Sciences 18(11): 768-778. doi: 10.1002/elsc.201800039

3. **Bié J**., Sepodes B., Fernandes P.C.B., Ribeiro M.H.L. (2022) Enzyme Immobilization and Co-Immobilization: Main Framework, Advances and Some Applications. Processes 10(3): 494. doi: 10.3390/pr10030494

4. **Chang Ben-Min** and Keller M. (2021) Cuticle and skin cell walls have common and unique roles in grape berry splitting, Horticulture Research 8(1): 168. doi:10.1038/s41438-021-00602-2

5. **Claus H**. and Mojsov K. (2018) Enzymes for Wine Fermentation: Current and Perspective Applications, Fermentation 4(3): 52. doi: 10.3390/fermentation4030052

6. **Comuzzo P.**, Iacumin L. end Voce S. (2022) Aging on lees. Morata A. (ed.) White Wine Technology, Academic Press, Elsevier, SAD, p. 247-267. doi:10.1016/B978-0-12-823497-6.00008-9

7. **Cosgrove D. J.** (2001) Wall Structure and Wall Loosening. A Look Backwards and Forwards, Plant Physiology 125(1): 131-134. doi: 10.1104/pp.125.1.131

8. **Espejo F.** (2021) Role of commercial enzymes in wine production: a critical review of recent research, Journal of Food Science and Technology 58(1): 9-21. doi: 10.1007/s13197-020-04489-0

9. **Fernandez-Pacheco P**., Garcia-Bejar B., Brionez Perez A.and Arevalo-Villena M. (2021) Free and Immobilised ß-Glucosidases in Oenology: Biotechnological Characterisation and Its Effect on Enhancement of Wine aroma, Frontiers in Microbiology 12:723815. doi: 10.3389/fmicb.2021.723815

10. **Gutierrez-Escobar R**., Aliano-Gonzales M. J. and Cantos-Villar E. (2021) Wine Polyphenol Content and Its Influence on Wine Quality and Properties: A Review, Molecules 26(3): 718. doi: 10.3390/molecules26030718

11. **Herjavec S.** i Maslov Bandić L. (2019) Vinarstvo, Nakladni zavod Globus, Zagreb.

12. **Hua Yang**, Guolin Cai, Jian Lu and Gomez Plaza E. (2020) The production and application of enzymes related to the quality o fruit wine, Critical Reviwes in Food and Nutrition 61(10): 1605-1615. doi: 10.1080/10408398.2020.1763251

13. **Hui-Chen Wu**, Bulgakov V.P. and Tsung-Luo Jinn (2018) Pectin Methylesterases: Cell Wall Remodeling Proteins Are Required for Plant Response to Heat Stress, Frontiers in Plant Science 9: 1612. doi:10.3389/fpls.2018.01612

14. **Guérin** L. and Pallas S. eds. (2021) Enzymes in oenology: Production, Regulation, applications, ITINERARIES No 26, Institut Francais De la Vigne et du Vin, Francuska. https://www.vignevin.com/wp-content/uploads/2019/03/CI_ENZYMES_ANG_VF2.pdf

15**. Jeng W.Y.,** Wang N.C., Lin M.H., Lin C.T., Liaw Y.C., Chang W.J., Liu C.I., Liang P.H. and Wang A.H. (2011) Structural and functional analysis of three β-glucosidases from bacterium Clostridium cellulovorans, fungus Trichoderma reesei and termite Neotermes koshunensis, Journal of Structural Biology 173(1): 46-56. doi: 10.1016/j.jsb.2010.07.008

16. **Kongliang Xu**,, Xuexiao Chen, Renchao Zheng and Yuguo Zheng (2020) Immobilization of Multi-Enzymes on Support Materials for Efficient Biocatalysis, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 8: 660. doi: 10.3389/fbioe.2020.00660

17. **Lallemand**, Lallzyme, OE (2014), HC (2017), Cuvee Blanc (2017), Cuvee Rouge (2017), Beta (2017), MMX (2021), Specification sheet, Application/Description.
https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/enzyme/docs/d1f8e17283622f16513d40b808bdd1150206b866.pdf
https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/enzyme/docs/be7036a5e7c90adc9cfac86f4141b8c70c904cd3.pdf
https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/enzyme/docs/ce9b9dd616faab56bf1c2f7ae34568393a66b70b.pdf
https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/enzyme/docs/8e7b1f2b5e58e4f48c15d57e9b06eadb4bf46464.pdf
https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/enzyme/docs/28ea41f3ace0447b8e490bdad3f18048285b1ea1.pdf
https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/enzyme/docs/f0d9e6de4dc623452d4ec654f41dc8303e968683.pdf

18. **Madadi M**., Tu Y, Abbas A. (2017) Recent Status on Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. Electronic J Biol, 13:2

19. **Marangon M**. (2017) New tools for white wine protein stabilisation, Acenologia. https://www.acenologia.com/new_tools_cienc1017/

20. **Mildner B**. (2010) Ugljikohidrati, PMF.
https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/14obk-p11-ugljikohidrati.pdf

21. **Mikac J.** (2014) Biokemija metaboličkih procesa i alkoholna fermentacija, Redak, Split.

22. **Nelson D.I**. and Cox M.M. (2008) Lehninger Principles of Biochemistry, W.H. Freeman and Co., New York, USA.

23. **O'Connor C. M.** and Adams J. U. (2014) Proteins Are Responsible for a Diverse Range of Structural and Catalytic Functions in Cells, Essentials of Cell Biology, Unit 2.5., Cambridge, MA: NPG Education, 2010. https://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-energy-and-cell-functions-14024533/

24. **Noronha H**. (2010) The effect of high temperature on sugar transport in grape cells, magistarski rad, Universidado do Minho, Braga, Portugal.

25. **Nunan K.** (1999) Cell wall Metabolism in Developing Grape berries, doktorska disertacija, The University of Adelaide, Adelaide, Australija.

26. **Ottone C**., Romero O., Aburto C., Illanes A. and Wilson L. (2020) Biocatalysis in winemaking industry: Challenges and opportunities for immobilized enzymes, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 19(2): 595-621. doi: 10.1111/1541-4337.12538

27. **Pinelo M**, Arnous A. and Meyer A.S. (2006) Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release, Trends in Food Science and Technology 17(11): 579 -590. doi: 10.1016/j.tifs.2006.05.003

28. **Quiroz-Castaneda R. E**. and Folch-Mallool J. L. (2013) Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars. Chandel A.K. and da Silva S.S. (eds) Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass, IntechOpen, London. doi: 10.5772/53719

29. **RESOURCE**, Application of enzymes in Winemaking, Comprehensive Technology Information, Creative Enzymes, SAD. https://www.creative-enzymes.com/resource/application-of-enzymes-in-winemaking_66.html

30. **Rong Ye**, Jie Zhao, Wickemeyer B.B., Toste F.P. and Samorjai G.A. (2018) Foundations and strategies of the construction of hybrid catalysts for optimized performances, Nature Catalisis 1: 318-325. doi: 10.1038/s41929-018-0052-2

31. **Russan A**. (2019) The Science of Enzymes in Winemaking, Fermentation 4,52. https://daily.sevenfifty.com/the-science-of-enzymes-in-winemaking/

32. **Silva-Barbieri D**., Salazar F.N., Lopez F., Brossard N., Escalona N. and Perez-Correa J.R. (2022) Advances in White Wine Protein Stabilization Technologies, Molecules 27(4): 1251. doi: 10.3390/molecules27041251

33. **Teixeira A**., Eiras-Dias J., Castellarin S.D. and Geros H. (2013) Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments, International Journal of Molecular Sciences 14(9): 18711-18739. doi: 10.3390/ijms140918711

34. **Ugliano M**. (2009) Enzymes in Winemaking. M.V. Moreno-Arribas, M.C. Polo (eds.), Wine Chemistry and Biochemistry, Springer Science+Business Media, LLC. doi: 10.1007/978-0-387-74118-5_5

35. **Van Sluyter S.C.,** McRae J.M., Falconer R. J., Smith P.A., Bacic A., Waters E.J. and Marongon M. (2015) Wine protein haze: mechanisms of formation and advances in prevention, Journal of Agricultural and Food Chemistry 63(16): 4020-4030. doi: 10.1021/acs.jafc.5b00047

36**. Wei Wang**, Scali M., Bianchi L.and Liangwei Liu (2009) Proteomic analysis of β-1-3-glucanase in grape berry tissues, Acta Physiologiae Plantarum 31(3): 597-604. doi: 10.1007/s11738-008-0269-9

37. **Yu Gao**, Zietsman A.J.J., Vivier M.A. and Moore J.P. (2019) Deconstructing Wine Grape Cell Walls with Enzymes During Winemaking: New Insights from Glycan Microarray Technology, Molecules 24(1): 165. doi: 10.3390/molecules24010165

Prikaz na naslovnici: Beta glucanase enzyme molecule.jpg
https://media.sciencephoto.com/image/f0095887/800wm/F0095887

Prikaz na poleđini: Enzymes, Biology 4ISC
https://biology4isc.weebly.com/uploads/9/0/8/0/9080078/945023603.png?415

Svi tekstovi autora dio su zbirke

„Od bobice do kapljice“

Vinarstvo

Biokemija metaboličkih procesa i alkoholna fermentacija

Redak (2014.)

Uloga enzima u vinarstvu *(radna varijanta)*

Vino – percepcija osjetilnih značajki *(radna varijanta)*

Vinogradarstvo

Zaštita trsja ***(****radna varijanta****)***

Zaštita vinograda pri organskom uzgoju *(radna varijanta)*

Rast loze – Abiotski poremećaji *(u nadogradnji)*

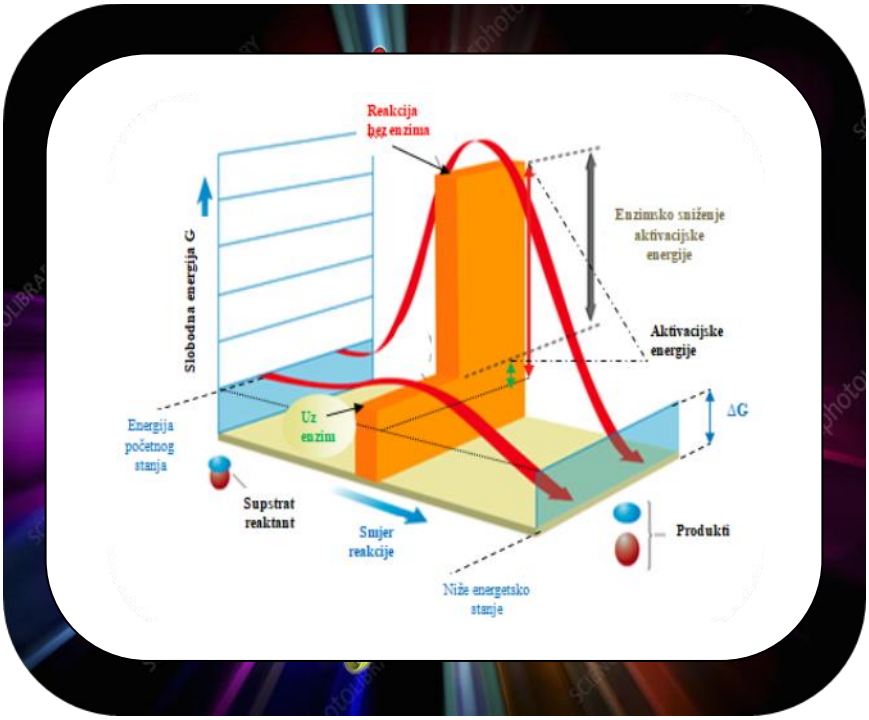
Bilješka o autoru

Josip Mikac mag. chem.

Rođen 1950. u Majerju, kod Varaždina.
U Zagrebu završio: osnovnu školu, Matematičku gimnaziju i Prirodoslovno matematički fakultet – Kemijski odsjek – smjer Fizikalna kemija – Kvantna kemija.
Dodatna usavršavanja: University of Leeds – Colour and Polymer Chemistry;
Akademija KoV-a – Kemija i fizika nitro-organskih spojeva;
Pučko otvoreno učilište – Tečaj- vinogradarstvo i vinarstvo.
Radno iskustvo: Chromos - od inženjera razvoja boja za zaštitu metala do direktora tvorničkog Instituta za razvoj, unapređenje i primjenu boja;
laboratorijski razvoj i pogonska obrada nitro-organskih materijala;
vinogradarstvo i vinarstvo za osobne potrebe.

Hrvatski branitelj iz Domovinskog rata.

Područja interesa: biokemija metabolizma kvasaca, alkoholna fermentacija, osjetilna percepcija vina, enzimi u vinarstvu, zaštita vinograda i abiotski učinci na vinovu lozu.


Reakcija bez enzima
Slobodna energija G
Enzimsko sniženje aktivacijske energije
Aktivacijske energije
Uz enzim
ΔG
Energija početnog stanja
Supstrat reaktant
Smjer reakcije
Produkti
Niže energetsko stanje