

Utjecaj lakaze i polivinilpirolidona na kvalitetu i fenolni sastav vina Laški rizling

Sažetak

Fenolni spojevi su poželjan sastojak vina zbog njihovog dobro poznatog pozitivnog učinka na zdravlje ljudi, međutim zbog podložnosti oksidaciji, mogu negativno utjecati na boju, stabilnost te ukupnu kvalitetu bijelog vina. Sumporni dioksidi, učinkovit antioksidans koji se koristi za stabilizaciju i sprječavanje posmeđivanja, izbjegava se zbog mogućeg štetnog utjecaja na zdravlje ljudi i kvalitetu vina. Stoga se koriste i istražuju druga sredstva kao npr. polivinilpolipirrolidon (PVPP) i lakaza. PVPP je sintetski polimer koji veže fenolne spojeve i time sprječava njihovu oksidaciju. Nasuprot tome, enzim lakaza katalizira oksidaciju fenolnih spojeva te ubrzava nastajanje visokomolekularnih smeđe obojenih polimera koji se uklanjaju odgovarajućim postupcima filtracije vina. Na taj način se sprječava naknadna oksidacija fenolnih spojeva te posmeđivanje i zamućenje vina.

S tim u vezi cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj tretmana PVPP-om ili lakazom na fizikalno-kemijska svojstva (udjeli etanola, ukupnog ekstrakta, hlapljivih i nehlapljivih kiselina, pH-vrijednost, intenzitet boje), senzorsku kvalitetu i koncentraciju pojedinih skupina fenolnih spojeva (flavonoidi, neflavonoidi, kondenzirani tanini, leukoantocijani) bijelog vina Laški rizling. Finalizacija netretiranog (kontrolnog) vina i vina tretiranih PVPP-om odnosno lakazom provedena je ultrafiltracijom. Odabrani uvjeti tretmana, provjereni su brzim testiranjem u laboratorijskim uvjetima: aroma je u vinu ostala nepromijenjena, a masena koncentracija koloida je smanjena. Stoga su isti uvjeti tretmana primijenjeni u industrijskom mjeriluteuglavnomnisuznačajnoutjecalinafizikalno-kemijskasvojstva, apoboljšalisusenzorskukvalitetu tretiranih vina. Smanjili su koncentracije svih skupina fenolnih spojeva i rezultirali manjim intenzitetom boje tj. svjetlijom bojom tretiranih od kontrolnog vina. Dobiveni rezultati ukazuju na prikladnost PVPP-a i lakaze u postupcima očuvanja boje i kvalitete bijelog vina Laški rizling.

Ključne riječi: bijelo vino, posmeđivanje vina, fenolni spojevi, lakaza, PVPP

Uvod

Polifenoli vina imaju važnu ulogu u formiranju arome, boje i okusa vina, imaju antioksidacijske učinke, a neki posjeduju antikancerogena, protuupalna i antibakterijska svojstva (Strong i Claus, 2011). Vjeruje se da polifenoli, posebno resveratrol u crvenim vinima, i vjerojatno ne-flavonoidni fenolni tirosol i hidroksitirosol u bijelim vinima (Zinnai i sur., 2013.; Raposo i sur., 2016) služe kao učinkovita sredstva za uklanjanje slobodnih radikala. Oni usporavaju uklanjanje dušikovog monoksida iz krvi i tako snižavaju krvni tlak i smanjuju rizik od srčanih problema i moždanog udara (Claus i sur., 2014). Međutim, polifenoli su podložni oksidaciji tijekom procesa proizvodnje vina i stoga su i glavni uzročnici negativnih promjena kao što su zamućenost, posmeđivanje i promjene arome i okusa (Escudero i sur., 2002; Ferreira i sur., 2002; Oliveira i sur., 2011; Zinnai i sur., 2013), a s druge strane može doći i do gubitka hranjive vrijednosti vina (Bonilla i sur., 2001; Sioums i sur., 2005).

U vinarskoj industriji je uobičajeno korištenje sumpornog dioksida za sprječavanje posmeđivanja i nepoželjnih senzorskih promjena te stabilizaciju vina, jer uz snažno antioksidacijsko djelovanje ima i antimikrobni učinak (Gurrero i sur., 2015; Raposo i sur., 2016). Međutim, upotreba SO₂ podrazumijeva i brojne nedostatke, poput narušavanja kvalitete neutralizacijom spoje-

¹ Dr. sc. Zrinka Čošić, prof. dr. sc. Branka Levaj, prof. dr. sc. Mara Banović,
Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska
Autor za korespondenciju: zcosic@plbf.hr

va arome (Ribéreau-Gayon i sur., 2006) i štetnih zdravstvenih učinaka poput pojave osjetljivosti i razvoja alergijskih reakcija, glavobolje i mučnine (Santos i sur., 2012; Valliy i sur., 2009) stoga je definirana maksimalna dozvoljena koncentracija u bijelim vinima 210 mg L⁻¹ (OIV, 2012). Jedan od glavnih izazova u suvremenoj enologiji je pronalaženje alternativnih postupaka ili sredstava koja mogu djelomično ili u potpunosti zamijeniti upotrebu sumpornog dioksida (Comuzzo i sur., 2003; Ribéreau-Gayon, 2006; Postolache i sur., 2012; Raposo i sur., 2016; Yildirim i sur., 2020). Želatina, kazein, albumin jaja, aktivni ugljen, bentonit i PVPP su primjeri komercijalnih sredstava koja se koriste u procesima bistrenje vina. PVPP je sintetski visokomolekularni polimer netopljiv u vodi čije se karbonilne skupine pomoću vodikovih mostova povezuju s niskomolekularnim fenolnim spojevima čime sprječava njihovu oksidaciju te posljedično posmeđivanje što doprinosi stabilizaciji vina. Uz primjenu PVPP-a smanjuje se udio ukupnih fenola, fenolnih kiselina, procijanidina, katehina, polifenola i proteina (Ficagna i sur., 2020). Međutim, primjena PVPP-a može rezultirati neželjenim promjenama senzorskih obilježja vina (Sims i sur., 1995), a u određenim uvjetima ne uklanja mutnoću u potpunosti (Ficagna i sur., 2020).

Moguća alternativa PVPP-u pri sprječavanju posmeđivanja vina je upotreba enzima difenoloksidaze, zvanog lakaza, koja selektivno djeluje na fenolne spojeve (Servili i sur. 2000; Minussi i sur., 2002; Claus i sur., 2014; Minussi i sur., 2007). Lakaza katalizira oksidacijske procese fenolnih spojeva i sudjeluje u njihovoj polimerizaciji pa se nastali smeđe obojeni polimeri mogu ukloniti tijekom finalizacije vina što pridonosi stabilnosti vina (Minussi i sur., 2007; Claus i sur., 2014; Sahay, 2019). Tretman lakazom je povoljan, jer je to „blaga tehnologija“ s manje agresivnim učincima na senzorske karakteristike vina (Servili i sur., 2000; Claus, 2017), koja selektivno uklanja fenolne spojeve, tako da ukupno smanjenje udjela fenolnih spojeva iznosi oko 30 – 40 %, ovisno o vrsti bijelog vina (Servili i sur., 2000). Također, Minussi i sur. (2007) utvrdili su da na učinkovitost lakaze osim vrste vina utječe koncentracija enzima i duljina tretmana te da tretman lakazom u većoj mjeri smanjuje koncentraciju ukupnih fenola, a u manjoj antioksidacijska svojstva vina. Lakaza je prikladna za primjenu u tehnologiji proizvodnje vina zbog svoje stabilnosti i aktivnosti u kiselom mediju (Claus i sur. 2014), također omogućuje ekološki prihvatljiviji tretman, umanjuje troškove prerade, te smanjuje mogućnost posmeđivanja vina tijekom dugog skladištenja (Minussi i sur., 2007). Unatoč brojnim istraživanjima koji se bave pojedinačnom primjenom navedenih sredstava za sprječavanje posmeđivanja bijelih vina, prema dostupnim podacima iz znanstvene literature do sada nisu nađena istraživanja koja paralelno istražuju utjecaj PVPP-a i lakaze primijenjenih u istom tehnološkom postupku na kvalitetu i fenolni sastav bijelih vina.

Također, bez obzira na dokazanu učinkovitost navedenih sredstava u uklanjanju polifenola, neophodno je provesti filtriranje vina radi uklanjanja oksidiranih spojeva nastalih dodatkom lakaze (Minussi i sur., 2002) ili PVPP-a. Membranske filtracije (Konja i sur. 1988; Cassano i sur., 2008) imaju niz prednosti pred tradicionalnim filtracijskim postupcima (El Rayess i sur., 2011).

Zbog svega navedenog, cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj tretmana PVPP-om i lakazom u kombinaciji s ultrafiltracijom na fizikalno-kemijska svojstva i senzorsku kvalitetu, te na pojedine skupine fenolnih spojeva bijelog vina Laški rizling.

Materijal i metode

Vino

Za istraživanje je korišteno bijelo vino proizvedeno od grožđa sorte Laški rizling. Fermentacija je provedena s komercijalnim kvascima vrste (*Saccharomyces cerevisiae*, UVAFERM 228, Lallemant, Austrija), nakon koje je slijedilo pretakanje. Od proizvedenog vina (cca. 16 000 L) izdvojen je dio (cca 50 L) za provođenje preliminarnih pokusa, a ostatak je korišten za provođenje pokusa u industrijskim uvjetima. U oba mjerila provedena su dva tretmana: tretman

PVPP-om i tretman lakazom, a kontrolno vino bilo je vino bez dodatka sredstava za sprječavanje posmeđivanja.

Tretmani za sprječavanje posmeđivanja i stabilizaciju vina

Istraživanje u laboratorijskim uvjetima koje je provedeno neposredno prije istraživanja u industrijskim uvjetima imalo je za svrhu brzu provjeru učinkovitosti odabranih uvjeta tretmana (koncentracija sredstava i vrijeme kontakta). Uvjeti tretmana odabrani su temeljem prethodnih istraživanja koji nisu obuhvaćeni ovim radom (rezultati nisu ovdje prikazani). Učinkovitost primijenjenih parametara provjerena je u laboratorijskom mjerilu određivanjem masene koncentracije koloida (odgovornih za naknadno zamućenje vina) te ukupne arome vina u odnosu na vino prije ultrafiltracije (osnovno vino). Stoga su tretmani u industrijskom pokusu provedeni s istim koncentracijama PVPP-a i lakaze te vremenom kontakta nakon čega su u dobivenim vinima određena osnovna fizikalno-kemijska svojstva i koncentracije fenolnih spojeva te senzorska analiza. U laboratorijskom pokusu svaki tretman je proveden s 10 L vina, a u industrijskom s oko 5 000 L.

Divergan F[®] (PVPP), BASF SA (Njemačka) dodan je vinu u koncentraciji 0,4 g L⁻¹, a lakaza, EC 1.10.3.2. u koncentraciji 0,3 g L⁻¹. Izvagana količina PVPP-a u prahu ostavljena je da bubri u manjem volumenu vina oko 2 sata, a potom je dodana vinu. U laboratorijskim uvjetima nabubreni PVPP dodan je ručno, a miješanje je provedeno na magnetskoj miješalici (MM-510, Tehnica, Slovenija). Prebacivanje u spremnik s vinom u industrijskim uvjetima provedeno je pomoću pumpe, U oba slučaja kontakt sredstva i vina uz cirkulaciju trajao je 30 minuta. Tijekom tretmana lakazom u spremnik s vinom je konstantno upuhivan kisik (99,9 % čistoće, Messer, Hrvatska) radi pospješivanja oksidacije i polimerizacije fenolnih spojeva. Vina s dodatkom PVPP-a odnosno lakaze su nakon taloženja dekantirana i ultrafiltrirana dok je kontrolno vino samo ultrafiltrirano.

Ultrafiltracija vina

Za ultrafiltraciju u laboratorijskim uvjetima je korišten je pločasti modul (mini Lab 10, De Danske Sukkerfabriker, Danska) s asimetričnim membranama od fluoropolimera FS 50 PP čija je granična molekulska masa (engl.cut-off) iznosila 30 000 Daltona. U industrijskom mjerilu korišten je cijevni modul Romicon, Winefilter II (Koch, SAD) s dva modula sa šupljim vlaknima, uz prosječni protok 300-600 L/h.

Fizikalno-kemijska analiza vina

Masena koncentracija koloida određen je metodom Wucherpfenniga i Dietricha (1983).

Kvantitativno određivanje udjela aromatičnih sastojaka vina provedeno je plinskom kromatografijom uz prethodnu ekstrakciju uzoraka smjesom otapala (dietil-eter : *n*-pentan = 2:1). U radu je korišten plinski kromatograf Hewlett-Packard HP 5890 GC (SAD) sa selektivnim detektorom masa Hewlett-Packard, HP 5970 MSD (SAD). Razdvajanje pojedinačnih spojeva u uzorcima provedeno je pomoću kapilarne kolone Carbowax 20 N dužine 30 metara (Sigma-Aldrich Co., SAD). Volumen uzorka za kromatografiju iznosio je 1 µl. Za termalnu desorpciju korištena je splitless tehnika. Plin nosač bio je helij 5,0 (čistoća 99,999%, Messer, Austrija) pri brzini protoka 5 ml/min. Temperaturni program bio je 3 minute 40°C, od 40 do 190°C po 50°C/min i 10 min na 190°C. Rezultati kvantitativne analize uzoraka tretiranih vina dobiveni su zbrajanjem vrijednosti svih komponenti arome, a izraženi u postocima zadržavanja arome u odnosu na osnovno vino.

Određivanje ukupnih alkohola i ukupnog ekstrakta provedeno je piknometrijski, prema EWG propisima (Amstblatt der Europäischen Gemeinschaften, 1990).

pH-vrijednost određena je pomoću pH-metra (SevenEasy pH Meter S20, Mettler Toledo, Switzerland).

Udio ukupnih, hlapljivih i nehlapljivih kiselina određen je metodama koje propisuje AOAC (Official Methods of Analysis, 1990).

Senzorsko ocjenjivanje vina provela je panel grupa od 7 senzorskih analitičara. Za ocjenjivanje je primjenjen Buxmanov model od maksimalno 20 bodova kojim su boja i bistroća ocjenjuju bodovima od 0 do 2, miris od 0 do 4, a okus od 0 do 12 (Nemanič, 1996).

Određivanje pojedinih skupina fenolnih spojeva

Ukupni fenoli te flavonoidni i neflavonoidni fenoli određeni su prema Singletonu (1974).

Određivanje leukoantocijana provedeno je metodom Wucherpfenniga i Millies (Ribéreau-Gayon i Stonestreet, 1966).

Kondenzirani tanini su određeni metodom prema Rebeleinu (1965).

Intenzitet boje određen je mjerenjem apsorbancije pri 420 nm (kivete 1 cm) (Paronetto, 1977).

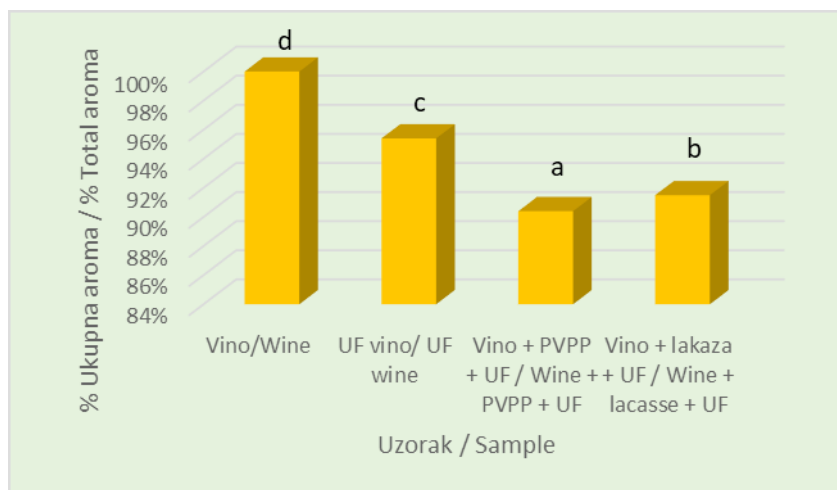
Za sva spektrofotometrijska mjerenja korišten je spektrofotometar Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2, (SAD). Sve analize provedene su u dva paralelna određivanja.

Statistička analiza

Statistička analiza provedena je pomoću Statistica ver. 8.0 softver (Statsoft Inc., Tulsa, SAD). Varijable su analizirane analizom varijance (ANOVA), dok su razlike među sredinama određene skupine određene Tukeyjevim testom. Nivo signifikantnosti za sve testove bio je $p \leq 0,05$.

Rezultati i rasprava

Prema rezultatima laboratorijskog pokusa vezano za ukupnu aromu vina određenu plinskom kromatografijom i izraženu u postocima kvantitavnog zadržavanja arome utvrđeno je da svi tretmani provedeni u ovom radu statistički značajno smanjuju ukupnu aromu (grafikon 1). Međutim, postotak zadržavanja arome u ultrafiltriranom vinu u odnosu na osnovno vino (početno vino koje nije tretirano ultrafiltracijom niti sredstvima korištenim u ovom radu) iznosio je 95,4 %, u tretiranom s PVPP-om 90,4 % te u tretiranom s lakazom 91,5% što konkretno predstavlja vrlo dobro zadržavanje ukupne arome.



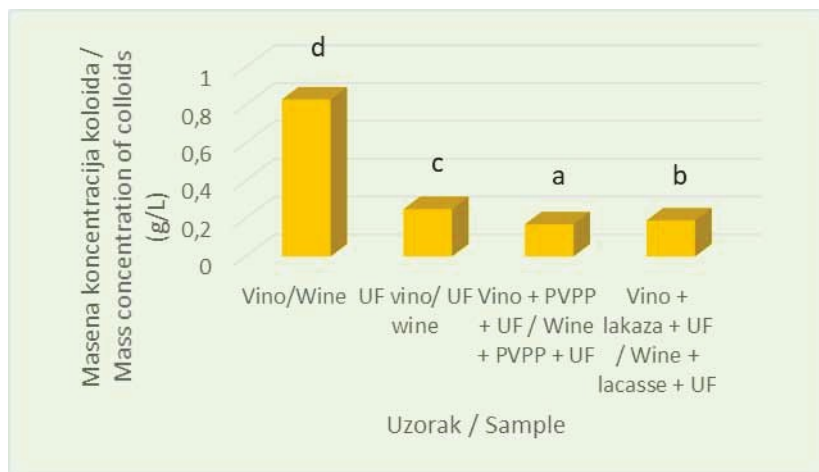
Različita slova impliciraju statističku signifikantnost na $p \leq 0,05$. UF – ultrafiltracija; PVPP – polivinilpolipirrolidon./ Different letters imply statistical significance at $p \leq 0,05$. UF – ultrafiltration; PVPP – polyvinylpolypyrrolidone

Grafikon 1. Udio ukupne arome ispitivanih vina (%) laboratorijskog pokusa

Graph 1. The level of total aroma (%) in examined wines of laboratory experiment

Masena koncentracija koloida praćena je radi provjere uspješnosti procesa bistrenja i stabilizacije vina (Ribéreau-Gayon, 2006). Dobiveni rezultati (grafikon 2) pokazuju statistički značajno smanjenje udjela koloida u svim vinima u odnosu na osnovno vino u kojem je određen najveći udio koloida ($0,83 \text{ mg L}^{-1}$). Ultrafiltracijom je masena koncentracija koloida smanjena za gotovo 70 % i iznosila je $0,25 \text{ mg L}^{-1}$, dok su tretmani s PVPP-om i lakazom doveli do dodatnog manje značajnog smanjenja, pri čemu je nešto manje koloida bilo u vinu tretiranom PVPP-om ($0,17 \text{ mg L}^{-1}$), nego lakazom ($0,19 \text{ mg L}^{-1}$). Takvi rezultati u skladu su sa saznanjima da je ultrafiltracija postupak namijenjen uklanjanju čestica mutnoće, a dodana sredstva su prvenstveno namijenjena uklanjanju fenolnih spojeva (Ribéreau-Gayon, 2006).

Provedeni pokus je potvrdio da primijenjeni tretmani nemaju izrazito nepovoljan utjecaj na ukupnu aromu vina, a uspješno su smanjili udio koloida, tako da su dalje korišteni u pokusu u industrijskom mjerilu kako bi se istražila njihova učinkovitost na uklanjanje fenolnih spojeva. U tom pokusu nije analizirano osnovno vino, već je kao kontrolni uzorak praćeno osnovno vino (bez ultrafiltracije i tretmana s PVPP-om i lakazom) obzirom da se željelo usporediti utjecaj tretmana sredstvima za sprječavanje posmeđivanja koja u drugom koraku uključuju ultrafiltraciju. Da bi se istražilo utjecaj tretmana PVPP-om i lakazom, osim određivanja fenolnih spojeva bilo je potrebno istražiti stabilnost osnovnih značajki vina poput volumnog udjela alkohola, koncentracije ekstrakta i kiselina te pH-vrijednosti.



Različita slova impliciraju statističku signifikantnost na $p \leq 0,05$. UF – ultrafiltracija; PVPP- polivinilpolipirrolidon./ Different letters imply statistical significance at $p \leq 0,05$. UF – ultrafiltration; PVPP – polyvinylpolypyrrolidone.

Grafikon 2. Količina ukupnih koloida u uzorcima vina laboratorijskog pokusa (g L^{-1})/
Graph 2. Amount of total colloids in wine samples of laboratory experiment (g L^{-1})

Prema podacima prikazanim u tablici 1. može se zamijetiti da se volumni udio alkohola u tretiranim vinima ne razlikuje značajno od udjela u kontrolnom vinu. Primijenjeni tretmani rezultirali su statistički značajnim manjim udjelom ukupnog ekstrakta i manjim pH-vrijednostima u odnosu na kontrolno vino, ali promjene udjela ukupnih, hlapljivih i nehlapljivih kiselina nisu bile statistički značajne. Dobiveni rezultati upućuju da primijenjeni tretmani nisu bitno utjecali na osnovna fizikalno-kemijska svojstva istraživanog vina što je u skladu s navodima u literaturi (Servili i sur., 2000).

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva vina industrijskog pokusa
Table 1. Physicochemical properties of wines from industrial experiment

Tretman vina / Wine treatment		UF	PVPP + UF	Lakaza + UF/ Laccase + UF
Alkohol/ Alcohol (% vol.)	p = 0,12	10,70 ± 0,05 ^a	10,51 ± 0,05 ^a	10,53 ± 0,05 ^a
Ukupni ekstrakt/ Total extract (g L ⁻¹)	p < 0,00*	36,70 ± 0,04 ^b	35,55 ± 0,04 ^a	35,75 ± 0,04 ^a
pH	p < 0,00*	3,28 ± 0,01 ^b	3,12 ± 0,01 ^a	3,06 ± 0,02 ^a
Ukupne kiseline (kao vinska)/ Total acids (as tartaric acid) (g L ⁻¹)	p = 0,08	6,09 ± 0,00 ^a	6,07 ± 0,00 ^a	6,10 ± 0,00 ^a
Hlapljive kiseline/ Volatile acids (g L ⁻¹)	p = 1,00	0,43 ± 0,01 ^a	0,43 ± 0,01 ^a	0,43 ± 0,01 ^a
Nehlapljive kiseline/ Nonvolatile acids (g L ⁻¹)	p = 0,84	5,66 ± 0,01 ^a	5,67 ± 0,01 ^a	5,67 ± 0,01 ^a

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna greška. * Statistički značajna varijabla pri $p \leq 0,05$. Različita slova znače statistički različite vrijednosti pri $p \leq 0,05$. UF - ultrafiltracija; PVPP – polivinil-polipirrolidon.

Results are expressed as mean ± SE. *Statistically significant variable at $p \leq 0,05$. Different letters mean statistically different values at $p \leq 0,05$. UF – ultrafiltration; PVPP – polyvinylpyrrolidone.

U ovom istraživanju određivani su fenolni spojevi i to ukupni, flavonoidni i neflavonoidni fenoli, te kondenzirani tanini i leukoantocijani. Od flavonoidnih fenola u vinu su najčešće prisutni flavonoli (kamferol, kvercetin i miricetin), te flavan-3-oli (katehin, epikatehin) koji mogu biti prisutni kao monomeri, oligomeri i polimeri. Njihovi oligomerni i polimerni oblici nazivaju se i proantocijanidini (procijanidini) ili kondenzirani tanini. Koncentracija kondenziranih tanina u bijelim vinima općenito ovisi o maceraciji te načinu prešanja, a uglavnom je manja od 100 mg L⁻¹. Monomerni katehini odgovorni su za gorak okus, a polimerni za trpkost vina. Također, katehini i kvercetin glikozidi sudjeluju u reakcijama posmeđivanja vina, stoga su u ovom radu određivani flavonoidni fenoli (Oliveira i sur, 2011). Flavan-3-oli mogu nastati biosintetski iz flavan-3,4-diola (leukoantocijanidina) (Jackson, 2008). Nadalje, neflavonoidne fenole u vinima predstavljaju derivati benzojeve i cimetne kiseline, stilbeni od kojih je najpoznatiji resveratrol, te hidrolizirajući tanini koji su esteri galne ili elaginske (derivati hidroksibenzojeve) kiseline. Od neflavonoidnih fenola u bijelim vinima su u najvećoj koncentraciji prisutni derivati hidrokscimetne kiseline (cimetna, *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska) koji su podložni reakcijama enzimskog posmeđivanja. Hidrolizirajući tanini potječu od hrastovih bačvi stoga u ovom radu nisu određivani (Oliveira i sur, 2011).

Rezultati istraživanja utjecaja tretmana na fenolne spojeve prikazani su u tablici 2. Vidljivo je da je tretiranje vina PVPP-om i lakazom rezultiralo značajnim smanjenjem udjela svih određivanih fenolnih skupina u odnosu na kontrolno vino, što je u skladu s rezultatima koji ukazuju na određena ograničenja učinkovitosti ultrafiltracije pri sprječavanju posmeđivanja vina (Godwin i Morris, 1991). Također, koncentracija ukupnih fenola u kontrolnom vinu je u granicama navedenim u literaturi za bijela vina (0,2 - 0,5 mg L⁻¹) (Oliveira i sur, 2011), a u tretiranim ispod donje granice. Oba su tretmana imala podjednak utjecaj na sve istraživane skupine fenolnih spojeva osim na neflavonoidne fenole na koje je tretman PVPP-om imao nešto veći utjecaj nego lakaza. Minussi i sur. (2007) navode vrlo različit utjecaj lakaze na neflavonoide ovisno

o vrsti vina. Najveće smanjenje tijekom oba tretmana uočeno je za leukoantocijane, čije su koncentracije bile gotovo 5 puta manje nego u netretiranom vinu. Tome je vjerojatno doprinijela i nestabilnost leukoantocijana, koja je njihovo poznato obilježje (Jackson, 2008). Općenito, postoje više istraživanja koja navode da na smanjenje fenolnih spojeva u vinu utječe tretman s PVPP-om (Wucherpfenning i Bretthauer, 1962; Fisagna i sur., 2020) kao i s lakazom (Maier i sur., 1990; Brenna i Bianchi, 1994; Servili i sur., 2000; Minussi i sur., 2007).

Intenzitet boje tj. apsorbancija pri 420 nm prati se kao mjera posmeđivanja (Mayén i sur., 1996) i manja je u tretiranim vinima što ukazuje na svjetliju boju tih vina i time manju podložnost naknadnom posmeđivanju, iako su sve izmjerene vrijednosti izrazito niske i znatno niže od vrijednosti u istraživanju Mayén i suradnika (1996).

Također je ispitan utjecaj tretmana na senzorsku kvalitetu vina. Iz rezultata prikazanih na slici 3. primjećuje se da je kontrolno vino značajno lošije ocijenjeno od tretiranih vina. Kako određeni fenolni spojevi utječu na aromu i okus vina (Oliviera i sur., 2011) može se zaključiti da su ovim tretmanima uklonjeni oni koji u određenoj mjeri narušavaju senzorsku kvalitetu vina. Od tretiranih vina nešto je bolje ocijenjeno ono s lakazom iako razlika nije statistički značajna. Dobiveni rezultati potvrđuju opravdanost primjene istraživanih sredstava.

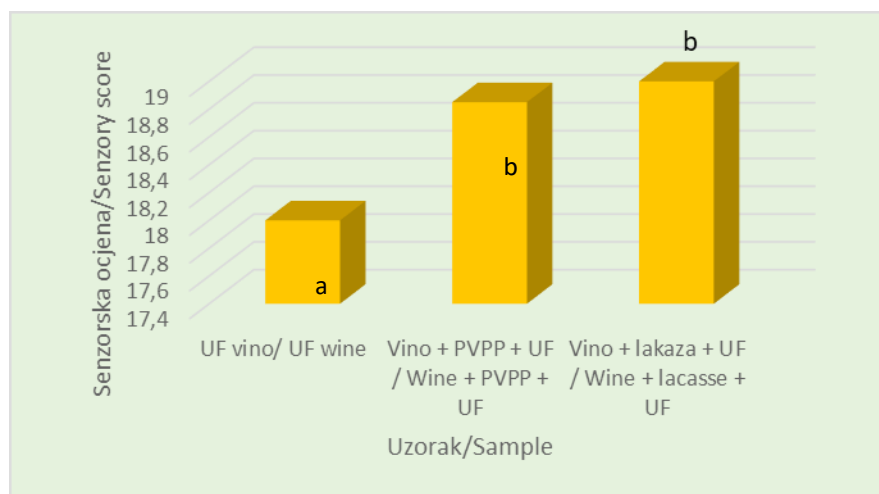
Tablica 2. Koncentracija ukupnih, flavonoidnih i neflavonoidnih fenola, kondenziranih tanina i leukoantocijana (mg L^{-1}) te apsorbancija pri $A_{420 \text{ nm}}$ u vinima obrađenim u industrijskom mjerilu

Table 2. Concentration of total, flavonoid and nonflavonoid phenols as well as condensed tannins, leucoanthocyanins and absorbance at $A_{420 \text{ nm}}$ in wines treated in industrial scale

Tretman vina / Wine treatment		UF	PVPP+UF	Lakaza + UF/ Laccase + UF
Ukupni fenoli / Total phenols (mg L^{-1})	$p < 0,00^*$	$222,6 \pm 1,00^b$	$187,6 \pm 1,00^a$	$190,5 \pm 1,00^a$
Flavonoidni fenoli/ Flavonoid phenols (mg L^{-1})	$p < 0,00^*$	$107,8 \pm 1,00^b$	$79,4 \pm 1,00^a$	$78,4 \pm 1,00^a$
Neflavonoidni fenoli/ Non flavonoid phenols (mg L^{-1})	$p = 0,04$	$114,8 \pm 1,00^b$	$108,2 \pm 1,00^a$	$112,1 \pm 1,00^{ab}$
Kondenzirani tanini / Condensed tannins (mg L^{-1})	$p < 0,00^*$	$15,6 \pm 0,07^b$	$13,8 \pm 0,07^a$	$13,6 \pm 0,07^a$
Leukoantocijani/ Leucoanthocyanins (mg L^{-1})	$p < 0,00^*$	$9,9 \pm 0,08^b$	$2,0 \pm 0,08^a$	$2,3 \pm 0,08^a$
Intenzitet boje $A_{420 \text{ nm}}$ Color intensity $A_{420 \text{ nm}}$	$p < 0,00^*$	$0,099 \pm 0,00^b$	$0,074 \pm 0,00^a$	$0,077 \pm 0,00^a$

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna greška. * Statistički značajna varijabla pri $p \leq 0,05$. Različita slova znače statistički različite vrijednosti pri $p \leq 0,05$. UF - ultrafiltracija; PVPP – polivinil-polirolidon.

Results are expressed as mean \pm SE. *Statistically significant variable at $p \leq 0,05$. Different letters mean statistically different values at $p \leq 0,05$. UF – ultrafiltration; PVPP – polyvinylpyrrolidone.



Različita slova impliciraju statističku signifikantnost na $p \leq 0,05$. UF – ultrafiltracija; PVPP - polivinilopipirolidon./ Different letters imply statistical significance at $p \leq 0,05$. UF – ultrafiltration; PVPP – polyvinylpolypyrrolidone.

Grafikon 3. Senzorska ocjena vina industrijskog pokusa ($g L^{-1}$)/
Graph 3. Sensory scores of wines from industrial experiment ($g L^{-1}$)

Zaključak

Laboratorijskim pokusom utvrđeno je da primijenjeni tretmani s PVPP-om i lakazom te ultrafiltracijom zadržavaju oko 90 % ukupne arome vina u odnosu na osnovno vino dok istodobno smanjuju udio koloida oko 80 %. U industrijskom mjerilu tretmani provedeni PVPP-om odnosno lakazom nisu doveli do promjena udjela alkohola i kiselina u vinu dok je došlo do blagog sniženja pH-vrijednosti i udjela ukupnog ekstrakta. Tretmani su rezultirali značajno manjim koncentracijama pojedinih skupina fenolnih spojeva u odnosu na kontrolno vino i to oko 10 % za ukupne fenolne spojeve, 25 % za flavonoide, 6% za neflavonoide, 12 % za kondenzirane tanine te čak do 80 % za leukoantocijane. Razlika između utjecaja PVPP-a i lakaze očitovala se samo u nešto većem smanjenju neflavonoida pod utjecajem PVPP-a nego što je uočeno primjenom lakaze. Boja obaju tretiranih vina bila je svjetlija, a njihove senzorske ocjene također su bile značajno bolje. Uzevši u obzir sve navedene rezultate, tretmani PVPP-om odnosno lakazom u kombinaciji s ultrafiltracijom pokazali su se učinkovitima za očuvanja boje i kvalitete bijelog vina Laški rizling.

Literatura

- Amstblatt der Europäischen Gemeinschaften (1990).
 Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J., and Medina, M. (2001) Yeasts used as fining treatment to correct browning in white wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49 (4), 1928-1933. DOI:10.1021/jf0006269
 Brenna, O., Bianchi, E. (1994) Immobilised laccase for phenolic removal in must and wine. *Biotechnology Letters*, 16 (1), 35-40. DOI:10.1007/BF01022620
 Cassano, A., Mecchia, A., Drioli, E. (2008) Analyses of hydrodynamic resistances and operating parameters in the ultrafiltration of grape must. *Journal of food engineering*, 89 (2), 171-177. doi:org/10.1016/j.jfoodeng.2008.04.015.
 Claus, H.; Sabel, A.; König, H. (2014) Wine phenols and laccase: An ambivalent relationship U: Rayess, Y.E., ur. *Wine, Phenolic Composition, Classification and Health Benefits*; New York, NY, USA, Nova Publishers.
 Claus, H. (2017) Microbial Enzymes: Relevance for Winemaking. U: König, H., Uden, G., Fröhlich, J., ur. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. 2nd ed.; Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 339 – 356. DOI:10.1007/978-3-319-60021-5_14

- Comuzzo, P., Tat, L. (2003) Alternatives to sulfur dioxide in enology. Part II: Red wines technology. *Industrie delle Bevande*, 32 (187), 450–462, 466.
- El Rayess, Y., Albasi, C., Bacchin, P., Taillandier, P., Raynal, J., Mietton-Peuchot, M., Devatine, A. (2011) Cross-flow microfiltration applied to oenology: A review. *Journal of Membrane Science*, 382 (1-2), 1-19. DOI: 10.1016/j.memsci.2011.08.008
- Escudero, A., Asensio, E., Cacho, J., Ferreira, V. (2002) Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food chemistry*, 77 (3), 325-331. DOI:10.1016/S0308-8146(01)00355-7
- Ferreira A.C.S., Guedes de Pinho, P., Rodrigues, P., Hogg, T. (2002) Kinetics of oxidativedegradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (21) 5919-5924. DOI:10.1021/jf0115847
- Ficagna, E., Gava, A., Rossato, S. B., Rombaldi, C. V., Borsato, D. (2020) Effect on Merlot red wine of fining agents mixture: application of the simplex centroid design. *Food Science and Technology*, 40 (3), 729-735. DOI:10.1590/fst.18719
- Goodwin, C. O., Morris, J. R. (1991) Effect of ultrafiltration on wine quality and browning. *American journal of enology and viticulture*, 42 (4), 347-353.
- Guerrero, R. F., Cantos-Villar, E. (2015) Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends in Food Science & Technology*, 42 (1), 27-43. DOI:10.1016/j.tifs.2014.11.004
- Jackson, R. (2008) Wine science: principles and applications. London: Academic Press, 281-295.
- Konja, G., Clauss, E., Kovacic, Z., Pozderovic, A. (1988) The influence of ultrafiltration on the chemical composition and sensoric characteristics of white and red wine. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 2 (4), 235-241.
- Maier, G., Dietrich, H., Wucherpfennig, K. (1990) Winemaking without SO₂ with the aid of enzymes? *Weinwirtschaft-Technik* 126, 18-22.
- Mayén, M., Barón, R., Mérida, J., Medina, M. (1997) Changes in phenolic compounds during accelerated browning in white wines from cv. Pedro Ximenez and cv. Baladí grapes. *Food Chemistry*, 58 (1-2), 89-95. DOI:10.1016/S0308-8146(96)00218-X
- Minussi, R. C., Pastore, G. M., Durán, N. (2002) Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 13 (6-7), 205-216.
- Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., Durán, N. (2007) Phenols removal in musts: strategy for wine stabilization by laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45 (3-4), 102-107. DOI:10.1016/j.molcatb.2006.12.004
- Nemanič, J. (1996) *Spoznajmo vino: vina in sorte, degustacija in ocenjevanje*. Ljubljana: Kmečki glas.
- Official Methods of Analysis* (1990) AOAC: Association of Official Analytical Chemists, Arlington.
- OIV. (2012). Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins. Paris: Organisation International de la Vigne et du Vin.
- Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V. Silva, A. M. (2011) Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44 (5), 1115-1126. DOI:10.1016/j.foodres.2011.03.050
- Paronetto, L. (1977) *Polifenoli e Tecnica Enologica*. Milano: Edagricole.
- Postolache E, Popescu C, Ciubuca A, Râpeanu G, Bulancea M. (2012) Dynamics of oxidative enzyme activity during the white grapes winemaking. *Journal environmental protection ecology*, 13:1608–1615.
- Raposo, R., Ruiz-Moreno, M.J., Garde-Cerdán, T., Puertas, B., Moreno-Rojas, J.M., Zafrilla, P., Gonzalo-Diago, A., Guerrero, R.F., Cantos-Villar, E. (2016) Replacement of sulfur dioxide by hydroxytyrosol in white wine: Influence on both quality parameters and sensory. *LWT- Food Science and Technology*, 65, 214-221. DOI:10.1016/j.lwt.2015.08.005
- Rebelein, H. (1965) Beitrag zur Bestimmung des Catechingehaltes in Wein. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 61, 182-183.
- Ribéreau-Gayon, P. Stonestreet, E. (1966) Dósaage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chimie Analytique*, 48 (4), 188-196.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. ur. (2006) *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications* (Vol. 1). Chichester: John Wiley & Sons.
- Sahay, S. (2019) Wine enzymes: Potential and practices. U: Kuddus M., ur., *Enzymes in Food Biotechnology*. London: Academic press. str. 73-92. DOI:10.1016/B978-0-12-813280-7.00006-2
- Santos, M. C., Nunes, C., Saraiva, J. A., Coimbra, M. A. (2012) Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *European Food Research and Technology*, 234 (1), 1-12.
- Servili, M., de Stefano, G., Piacquadio, P., Sciancalepore, V. (2000) A novel method for removing phenols from grape must. *American journal of enology and viticulture*, 51, 357–361.
- Sims, C. A., Eastridge, J. S. i Bates, R. P. (1995) Changes in phenols, color, and sensory characteristics of muscadine wines by pre- and postfermentation additions of PVPP, casein, and gelatin. *American journal of enology and viticulture*, 46, 155-158.
- Singleton, V.L. (1974) Analytical fractionation of the phenolic substances of grapes and wine and some practical uses of such analyses. U: Webb, A.D., ur. *Chemistry of Winemaking*. Washington, D.C.: American Chemical Society, 184-211. DOI: 10.1021/ba-1974-0137.ch009
- Sioumis, N., Kallithraka, S., Tsoutsouras, E., Makris, D. P., Kefalas, P. (2005) Browning development in white wines: Dependence on compositional parameters and impact on antioxidant characteristics. *European food research and technology*, 220 (3-4), 326-330. DOI: 10.1007/s00217-004-1032-0

- Strong, P.J., Claus, H. (2011) Laccase: a review of its past and its future in bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 41 (4), 373-434. DOI:10.1080/10643380902945706
- Vally, H., Misso, N. L. A., V. Madan, V. (2009) Clinical effects of sulphite additives, *Clinical & Experimental Allergy*, 39 (11), 1643–1651. DOI:10.1111/j.1365-2222.2009.03362.x
- Wucherpfennig, K., Bretthauer, G. (1962) Versuche zur stabilisierung von Wein gegen oxidative Einflüsse durch Behandlung mit Polyamidpuder. *Weinberg Keller*, 9, 37-55.
- Wucherpfennig, K., Dietrich, H. (1983) Bestimmung des Kolloidgehaltes von Weinen. *Lebensmitteltechnik*, 15 (5), 246-253.
- Zinnai, A., Venturi, F., Sanmartin, C., Quartacci, M.F., Andrich, G. (2013) Chemical and laccase catalysed oxidation of gallic acid: determination of kinetic parameters. *Research Journal of Biotechnology* 8 (7), 62-65.
- Yıldırım, H. K., Darıcı, B. (2020) Alternative methods of sulfur dioxide used in wine production. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9 (4), 675 – 687. DOI:10.675-687. 15414/jmbfs.2020.10.2.159-165

Prispjelo/Received: 9.11.2020.

Prihvaćeno/Accepted: 30.11.2020

Original scientific paper

Influence of laccase and polyvinylpyrrolidone on the quality and phenolic composition of Laški Riesling wine

Abstract

Phenolic compounds, with their well known positive effect on human health, are a desirable constituent of wine, however, due to their susceptibility to oxidation, they can negatively affect the color, stability and overall quality of white wines. Sulphur dioxide, the effective antioxidant used for wine browning prevention and stabilization, is avoided cause of possible harmful effect on human health and wine quality. Therefore, other agents such as polyvinylpyrrolidone (PVPP) and laccase are used, and investigated as well still, too. PVPP (a synthetic polymer) binds phenolic compounds and thus prevents their oxidation. In contrast, the enzyme laccase catalyzes the oxidation of phenolic compounds and accelerates the formation of high molecular weight brown polymers which are removed in finalization processes such as ultrafiltration. In this way, the subsequent oxidation of phenolic compounds as well as wine browning and turbidity are prevented. Considering the above facts, the aim of this study was to examine the effectiveness of treatment with PVPP or laccase, combined with ultrafiltration, on the physicochemical properties (contents of ethanol, total extract, volatile and non-volatile acids, pH value, color intensity), sensory quality and the concentration of individual groups of phenolic compounds (flavonoids, neoflavonoids, condensed tannins, leucoanthocyanidins) of Laški Riesling white wine. Finalization of untreated (control) wine and wines treated with PVPP or laccase and treated wines was performed by ultrafiltration. The selected experimental conditions were previously tested in laboratory scale and confirmed that colloid content was reduced by treatments with PVPP or laccase. While wine aroma was not significantly impaired. Further, the same treatments were applied in the industrial conditions and according to obtained results they did not significantly affect the basic physicochemical properties, but improved the sensory quality of the treated wines. Therefore, the same treatment conditions were applied in industrial scale and generally did not significantly affect the physico-chemical properties, while the sensory quality of the treated wines were improved. The concentrations of all groups of phenolic compounds and color intensities were reduced in the treated wines when compared to color control wine. The obtained results indicate the suitability of both PVPP and laccase in the processes of stabilization and color preservation of white wine Laški Riesling.

Keywords: white wine, browning, phenolic compounds, laccase, PVPP