Киро Мојсов

Југослав Зибероски Звонимир Божиновиќ

Мери Петреска

**Примена на ензими во винарската индустрија**

**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

BIGOSS

Рецензенти:

**Проф. д-р Михаил Петков**

**Проф. д-р Мирче Наумовски**

Редакција:

Уредник:

**Елизабета Симоска**

Ликовно-графички уредник:

**Михајло Трендафилов**

Лектура и коректура:

**проф. Бисерка Токова**

компјутерска обработка:

**Горјан Темелковски**

Издавач:

**БИГОСС – Скопје**

(02) 3117-398

За издавачот:

М-р Стево Темелковски

e-mail: bigoss@unet.com.mk

Печати: **РИ-Графика - Скопје**

Скопје, 2011.

© Киро Мојсов 2011.

Сите права се заштитени. Ниту еден дел од оваа книга не може да биде репродуциран, или пренесен во која било форма, или со кои било средства, електронски или технички, вклучувајќи и фотокопирање, преснимување, или чување во информативни системи, без претходна писмена дозвола од издавачот/авторот.

БИГОСС – Скопје

Ѓуро Стругар 15, Скопје

Р. Македонија

тел: 02/61 33 685

e-mail: bigoss@unet.com.mk

**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

CIP – Каталогизација во публикација

Национална и универзитетска библиотека ″Св. Климент Охридски″,

Скопје

577.15:663.2

 Примена на ензими во винарската индустрија / Киро Мојсов ... [и

др.]. – Скопје : Бигосс, 2011. – 110 стр. : граф. прикази ; 21 см

Автори: Киро Мојсов, Југослаав Зибероски, Звонимир Божиновиќ, Мери Петреска. – Библиографија: стр. 91-100

ISBN 978-9989-44-154-7

1. Mојсов, Киро [автор]

а) Ензими – Употреба –Винарска индустрија

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**Предговор**

 Во последниве години е посебно нагласен стремежот на нашата земја да се вклучи во европските асоцијации, а со тоа се менува и ставот на менаџерите и сопствениците на винарии во правец на постигнување врвен квалитет на производите и услугите.

 Традиционалниот начин на производство на вино не може во целост да одговори на прашањата со кои се соочува современото работење на винарските индустрии од типот: како да се произведе вино со подобар квалитет т.е. побистро, појака боја, постабилна боја, повеќе фенолни соединенија, повеќе арома, подобар вкус, и се разбира постабилно вино, и олеснета т.е. побрза филтрација, побрзо таложење и побрзо созревање на виното т.е. како поекономично би било конкурентно на светскиот пазар, како според квалитетот така и според цената на чинење.

Со примена на модерна биотехнологија во производството на вино, како во големите, така и во помалите винарии, ќе се се добие поголеми приноси, вино со подобар квалитет во секој поглед, и олеснети или скратени операции т.е. на поекономичен начин, што е и цел на секоја винарија. Со ваков пристап на работење винариите може да се натпреваруваат со квалитетни вина, како на домашниот така и на странскиот пазар.

Голем дел од ова може да се постигне со употреба на соодветни комерцијални пектинолитички ензими. За подобро да се согледаат предностите на примената на ензимите во правењето на вино во споредба со традиционалниот начин на производство, во детали е објаснето што се ензими, како се произведуваат, каде може да се набават, каков тип на ензими да се набави, за какво вино (црвено или бело) да се набават, која цел да се постигне со примената и др..

Книгава е составена од пет глави, а посочено е прилично литература за сите глави што се обработени во неа, со цел читателот што поцелосно да се запознае со соодветната проблематика.

Објаснето е сè за ензимите, нивниот состав, потекло, производство, класификација, кои ензими се употребуваат во производството на вино, структурата и составот на грозјето, производството на вино, оценувањето на квалитетот на виното и употребата на ензими во правењето на вино.

Во посебна, петта глава е објаснета употребата на ензимите во винарската индустрија, што ќе биде од голема корист за винариите, енолозите што се занимаваат со директното производство на вино, како и за студентите по винарство како идни земјоделски инженери.

Поради сиве овие предности при преработката на грозјето во вино се појавува потребата од изнаоѓање можности за ефикасно користење на пектинолитичките ензимски препарати, добиени со чисти култури на микроорганизми во винарската индустрија, како основа за нивно понатамошно воведување во помалите и поголемите винарии. Со ова ќе се намали времето што е потребно за некои технолошки операции, ќе се добие вино со повисок сензорски квалитет и на поекономичен начин. Токму поради овие причини ја напишавме оваа книга и веруваме дека ќе даде голем придонес на сопствениците на винариите, енолозите и другите инженери што работат на производство на вино во помалите и поголемите винарии, студентите од факултетите за технолошки и земјоделски науки каде што се проучува винарството, и сите што имаат интерес за оваа област од науката.

Им благодариме на рецензентите проф. д-р Мирче Наумовски и проф. д-р Михаил Петков кои со своите сугестии придонесоа во подобрувањето на текстот.

 Однапред сме благодарни на секоја добронамерна критика и сугестија бидејќи кај нас оваа книга претставува прво издание од оваа област.

Скопје, 2011 год.

Од авторите

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **СОДРЖИНА** |  |  |  |  |  |
|  | **Предговор****Вовед****Глава 1. Ензими во правење на виното**Пектин и пектиназиПектинази од *Aspergillus niger*Хемицелулоза и хемицелулази | 1 |
|  | 7 |
|  | 10 |
| 1.1. 1.1.1.  | 1012 |
| 1.1.2. | 14 |
| 1.1.3. | Целулоза и целулази | 16 |
| 1.2. | Комерцијални пектинолитички ензимски препарати | 17 |
| 1.2.1. | Состав | 17 |
| 1.2.2. | Својства | 17 |
| 1.2.3. | Производство | 18 |
| 1.2.4.1.2.5.1.2.6.1.2.7. | Специфични употребиКомерцијални пектинолитички ензимски препарати кои се користат за овошна обработкаКомерцијални пектинолитички ензимски препарати кои се користат во винарската индустријаСтранични активности на комерцијални пектинолитички ензимски препарати**Глава 2. Грозје** | 1919222831 |
| 2.1. | Грозје и структура на зрно од грозје | 31 |
| 2.1.1. | Механички и хемиски состав на грозјето | 32 |
| 2.2.2.3. | Структура на клетката на лушпа од грозјеПектини во грозјето | 3538 |
| 2.4. | Полифеноли во грозје и вино | 41 |
| 2.4.1.  | Нефлавоноиди | 43 |
| 2.4.2.  | Флавоноиди | 45 |
| 2.4.2.1. | Антоциани | 46 |
| 2.4.2.2. | Флаван-3-ол мономери | 49 |
| 2.4.2.3. | Проантоцианидини (танини) | 49 |
|  | **Глава 3. Вино** | 51 |
| 3.1. | Производство на вино | 51 |
| 3.1.1. | Берење и преработка на грозјето | 51 |
| 3.1.2. | Алкохолнa ферментација на смесата или ширата | 54 |
| 3.1.3. | Мацерација и видови мацерација | 57 |
| 3.1.4. | Формирање на правиот (вистинскиот) квалитет на виното | 62 |
| 4.1. | **Глава 4. Оценување на квалитетот на вино**Органолептичко оценување (стручно дегустациско-сензорно) на виното | 7070 |
| 4.2.4.2.1. | Основни хемиски анализи на виноОдредување содржина на алкохол во вино | 7373 |
| 4.2.2.4.2.3.4.2.4. | Одредување количество вкупни киселини во виноОдредување количество екстракт во виноОдредување специфична тежина на вино | 747575 |
| 4.2.5.4.3. | Одредување *pH* на виноОдредување интензитет на боја, нијанса, состав на бојата и сјајност на виното | 7677 |
| 4.4. | Полифенолни соединенија во виното | 77 |
| 4.4.1. | Анализа на вкупни феноли | 77 |
| 4.4.2. | Анализа на вкупни антоциани | 78 |
| 4.4.3. | Анализа на вкупни флавоноиди | 78 |
| 4.4.4. | Анализа на вкупни катеини | 79 |
| 4.5. | Микробиолошка исправност на вина | 79 |
| 4.5.1.5.1.5.2.5.3. | Микробиолошки анализи на вино**Глава 5. Примена на ензими во правење на виното**Примена на пектинолитички ензими во правење на винотоПроизводство на ензими за правење на винотоСостав на ензимите за правење на виното | 8085858888 |
| 5.3.1. | Пектинази | 88 |
| 5.3.2.5.3.3.5.3.4. | Единици на пектиназна активностГликозидазиГлуканази | 898990 |
| 5.3.5.53.6. | Други странични активностиХемицелулази и целулази | 9091 |
| 5.3.7. | Цинамил-естерази | 91 |
| 5.3.8. | Антоцианаза | 92 |
| 5.4. | Формулирање на ензимите за правење на виното | 92 |
| 5.4.1. | Микро гранулирани ензими | 92 |
| 5.4.2. | Течни ензими | 93 |
| 5.5. | Ензими за правење бело вино | 93 |
| 5.5.1. | Ензими за таложење | 93 |
| 5.5.2. | Ензими за мацерација | 94 |
| 5.6 | Ензими за правење црвено вино | 95 |
| 5.6.1. | Ензими за мацерација | 95 |
| 5.7. | Созревање талог | 95 |
|  | Литература | 97 |

**Вовед**

Ензимите биле откриени во втората половина од деветнаесттиот век, и од тоа време биле целосно користени во неколку индустриски процеси. Ензимите се ефикасни и многу специфични биокатализатори. Со напредокот во биотехнологијата при последните три декади, посебно во областа на генетиката и микробиологијата, како и во протеинското инженерство, ензимите го нашле своето место во многу нови индустриски процеси. Микробните ензими биле и се користени во многу еколошки и индустриски сектори. Во минатиот век, имало огромно зголемување на свеста за ефектите од загадувањето, па јавниот притисок влијаел врз индустријата и врз Владата. Се појавиле зголемени барања за замена на некои традиционални хемиски процеси со биотехнолошки процеси, вклучувајќи чисти култури микроорганизми и ензими што биле произведени од микроорганизми како што се пектинази, целулази, ксиланази, лигнинази и др.. Користењето на микробиолошки ензими ќе обезбеди поуспешно управување на технолошките процеси за постигнување на саканата цел.

Пектините се присутни во ткивата кај сите виши растенија, исполнувајќи ги меѓуклеточните простори и се разликуваат во својот состав. Растителните ткива се формирани од клетки кои се одвоени со ѕидни клетки, наспроти животинските клетки. Пектинот е претставен како меѓуклеточен кит и заедно со хемицелулозата формира дел од sидот. Пектинот припаѓа на групата на полисахариди. За главните полисахаридни синџири се прикачени други покуси или подолги, прави (нормални) или разагранети сахаридни синџири.

Пектинските ензими се способни да ги раскинат овие синџири и сахаридните врски меѓу синџирите. Пектинските ензими познати како пектинази, вклучуваат полигалактуронази, пектинестерази, пектин-лиази и пектат-лиази, зависно од нивниот начин на делување [1].

Количеството на пектин во овошјето зависи од многу фактори, посебно од видот на овошјето и од степенот на зрелост. Во зрело винско грозје е најдено од 0,2 до 3% пектин [1]. Во винарската индустрија при преработка на гозјето во вино, овие пектински материи, смолести и слузести материи во ширата и виното, како заштитни колоиди го отежнуваат природното бистрење и филтрирање на виното. Кога се во прашање пектините, најдено е решение во примената на комерцијални пектинолитички ензимски препарати. Хемиското делување на ензимските препарати се состои во тоа што пектинолитичките ензими го ослободуваат пектинот од несаканото заштитно влијание, па доаѓа до забрзано бистрење на виното. Пектинолитичките ензимски препарати се добри за обработка на сокот (ширата), добиен од изгмечени бели грозја и смесата од изгмечени црвени грозја, како и на младото вино. Овие препарати се корисни за поефикасна екстракција на саканите црвени пигменти и други фенолни соединенија кои се врзани во растителните клетки т.е. полесно и побрзо ослободување во ширата. Како било, со примена на ензими се постигнува побрзо разградување на клетките од лушпите со што пак се постигнува побрза екстракција на антоцијаните (главно) од лушпата и ја појачуваат бојата; кај црвените и белите вина обезбедуваат јака и стабилна боја, ослободуваат ароматични компоненти (особено важно за белите вина, но секако и за црвените), односно хидролиза на глукозидите и ослободување на ароматични компоненти со штоја појачуваат аромата, ја смалуваат вискозноста, го скратуваат времето за бистрење и филтрација, даваат поголема стабилност на вината и подобри вина [2-7].

Поради сите овие предности при преработката на грозјето во вино се појавува потреба од изнаоѓање можности за ефикасно користење на пектинолитичките ензимски препарати, добиени со чисти култури на микроорганизми во бистрење на вината, како основа за нивно понатамошно воведување во помалите и поголемите винарии. Со ова ќе се намали потребното време за некои технолошки операции, ќе се добие вино со повисок сензорски квалитет и на поекономичен начин. Токму поради овие причини ја напишавме оваа книга. Веруваме дека ќе даде голем придонес на сопствениците на винариите, енолозите и другите инженери што работат на производство на вино во помалите и поголемите винарии, студентите од факултетите за технолошки и земјоделски науки каде што се проучува винарството, и на сите што имаат интерес за оваа област од науката.

**Глава 1. Ензими во правење на виното**

 Протеини кои функционираат како биолошки катализатори се нарекуваат ензими. Ензимите ги забрзуваат специфичните метаболични реакции и може да ги зголемат реакциите повеќекратно, и често се специфични за еден супстрат. Тие се добиваат во живите клетки од растенијата, животните и микроорганизмите. Активните компоненти на ензимите содржат биолошко активни протеини. Овие протеини имаат високо комплексна структура и може да бидат врзани со метали, јаглехидрати и липиди.

 Ензимската активност расте со температурата до 40⁰С, над 40⁰С до 60⁰С опаѓа, а над 60⁰С ензимската активност запира кога сите ензими се денатурираат. Ензимската активност е голема во широк опсег на *рН* и затоа сите ензими се активни, но секој ензим има свој оптимален *рН* на делување.

**1.1. Пектин и пектинази**

Зрното од грозје има три главни типа ткива: месо, лушпа и семе. Зрното од грозје е поделено во клетки, а тие се одвоени една од друга со клеточни sидови кои дозволуваат минење низ селективни мембрани на посебни соединенија кои се неопходни за клетката.

 Клеточните sидови се направени од комплекс полисахариди, наречени пектини и овие соединенија ја обезбедуваат структурата и цврстината на клетките. Во клетките е цитоплазмата која содржи јадро, пластиди и ензимски системи, како и вакуоли во кои има шеќери, киселини, антоциани и танини. Пектините се концентрирани во sидовите на средните ламели меѓу клетките, а полимерите на галактуронските киселини често се високо метилирани. Рамноза, арабиноза, галактани и арабиногалактани може да бидат вклучени во пектинските материи. Клеточните sидови имаат повеќе хемицелулозни и целулозни соединенија. Споредниот клеточен sид е најмногу пектин, со нешто лигнин, додека основниот клеточен sид е најмногу застапен со целулозни влакна што се наречени микрофибрили, во средина од пектини, хемицелулози и протеини.

 Молекулите кои ја прават средната ламела, од основните и споредните клеточни sидови се релативно различни. Различни се на степенот на метилирање, странично разгранување со различни соединенија, и физичката структура. Според тоа одредени ензими може да остварат одредени својства на супстратите и нивно деградирање.

 Пектинот е веројатно една од најкомплексните макромолекули што се најдени во природата.Тој е хетерополисахарид кој се наоѓа во средната ламела и основниот клеточен sид од повисоките растенија. Пектините функционираат како „лепак“ кој ги држи заедно другите полисахариди во клеточниот sид, како целулоза и хемицелулоза (т.е. ксилоглукан или глукуронарабиноксилан), и протеини, такви како што е хидроксипиролин.

Екстракцијата очигледно бара sидовите на средната ламела да бидат деградирани за да ги ослободат клетките, а клеточните sидови да бидат раскршени за да дозволат содржината во вакуолите да биде екстрахирана, или дифундирана во виното. Ова може да биде постигнато со употреба на механичка мацерација, топлина, хемикалии како SO2, или со употреба на **пектинолитички ензими**.

 Пектинските количества се околу 1/3 од вкупниот материјал на клеточниот sид [8]и како такви претставуваат важна С-суровина за бактерии и габи кои го деградираат и распаѓаат растителниот материјал. Комплетната биодеградација на комплексот и хетерогената структура на пектинот со микроорганизми бара присуство на многу различни ензимски активности.

**1.1.1. Пектинази од *Aspergillus niger***

 Со претпоставен класичен модел на пектин, ензимите што се вклучени во деградација на пектинот може да бидат формално групирани во две главни класи: пектинази кои го напаѓаат пектинскиот ’рбет и помошни ензими кои се вклучени во деградацијата на страничните синџири од пектинот [9].

Има четири типа ензими пектинази, кои се разликуваат според нивната активност на различни типови од пектин-супстрати [10]:

* **Пектин-естерази (РЕ)** ги отстрануваат метокси-групите од многу метоксилиран пектин и дава метанол и слабо метоксилиран пектин. РЕ од растенијата делува систематски на синџирот, произведува области од деестерифициран пектин на синџирот, додека РЕ од габично (фунгално) потекло делуваат случајно.
* **Полигалактуронази (РG)** е деполимераза и делува со цепење на синџирите меѓу единиците на неестерифицираните галактуронски киселини во синџирот. ЕндоPG делува случајно на синџирот, но егзоPG само ги кинат врските на нередуцирачкиот крај од синџирот. РЕ и ендоРG често се користат заедно во пектинолитички препарати во преработката на грозје.
* **Пектин-лиази (РL)** делуваат случајно на синџирот за деполимеризирање на полигалактуронаните во сличен правец како ендоРG, но PL се разликуваат според тоа што делуваат на врските меѓу метилираните молекули.
* **Пектат-лиази (РLY)** помалку се употребуваат за преработка на грозје. Тие делуваат случајно да ги расцепат глукозидните врски меѓу молекулите на неметилирани галактуронски киселини во слабо метоксилиран пектин. Во овој поглед тоа е слично со ендоРG, но како и да е, РLY има апсолутно барање за Са2+ и бара високо *рН* (8-9).

PE и PG се ендогени во грозјето на ниски концентрации, но PE се инхибирани од етанолот и полифенолите.

На Сл. 1 е даден преглед на ензимски активности вклучени во пектинската деградација. Прикажани се точките на делување на различните типови пектинази во ’рбетот на пектинот.



**1.1.2. Хемицелулоза и хемицелулази**

Хемицелулозите се многу разгранети полисахариди кои се водородно поврзани со површината од целулозните микрофибрили. Тие се пократки отколку целулозните синџири и спротивно на целулозата, обично не формираат кристална структура. Хемицелулозните разгранувања помагаат на врзувањето на микрофибрилите еден со друг и со друга средина, соединенија, особено со пектин. Овие вкрстени врски на целулозните микрофибрили во мрежа од цврсти, влакнести молекули се одговорни за механичката јачина на растителните клеточни sидови. Во растенијата како што се лен, памук или коноп, ксилозата е составена од хемицелулози-ксилани кои се најобични примери [11].

 Хемицелулозите се составени од четири главни полисахариди: арабинани, галактани, ксилани и ксилоглукани. Арабинаните имаат ’рбет од α-1,5 поврзана со арабинофураносил, и разгранување со молекули на арабинофураносил кое се случува на секоја трета единица низ должината на синџирот. Галактаните имаат ’рбет од остатоци од D-галактопираносил кои се поврзани со едното или другото β-1,4 или β-1,3. Овие синџири може да бидат заменети со арабинофураносил групи или арабинани и да се добијат арабиногалактани.

 Има три форми на ензими арабинази. Арабинозидаза А ги цепи арабинан- олигомерите на мономери. Арабинозидаза В ги цепи разгранетите арабинани и се добива линеарен синџир со отстранување на крајните поврзани α-1,3 арабинофураносил странични синџири. Во исто време овој ензим ги цепи крајните арабинофураносилни групи од нередуцираниот крај на линеарниот синџир. Ендоарабиназата случајно го хидролизира линеарниот синџир и го раздробува во олигомери.

 Има две форми на ензими галактанази, и тоа ендогалактаназа и галактаназа. Ендогалактаназата делува случајно на галактан-синџирот, раскинувајќи ги β-1,4 врските, додека галактаназата делува случајно за раскинување на β-1,3 и β-1,6 врските.

**1.1.3. Целулоза и целулази**

Целулозата е во изобилие во основните и споредните клеточни sидови, и сочинува 20-30% од сувата материја од најмногу основни клеточни sидови [10]. Тоа е линеарен полимер од глукозни остатоци, кои се поврзани со β-1,4 врски, овозможувајќи им на полисахаридите да формираат долги прави синџири. Неколку снопчиња од такви синџири се здружуваат во паралела со други такви и формираат кристални снопови кои се наречени микрофибрили. Многубројни водородни врски на надворешниот и внатрешниот синџир обезбедуваат крутост. Својствата на целулозата може да се променливи во зависност од степенот на полимеризација и степенот на кристалност. Целулозата со понизок степен на кристалност е полесно цеплива за ензимите.

 Во клеточниот sид, целулозните микрофибрили се вградени во состав кој се состои од протеини, лигнин, хемицелулозa и пектин [12].

 Целулазата е систем од ензими кој вклучува ендоглуканаза, егзоглуканаза и целобиаза (β-глукозидаза). Ендоглукaназата случајно ги хидролизира β-1,4 глукозните врски во синџирот, додека егзоглуканазата само ги цепи врските на нередуцираниот крај и се добива друга глукоза, или нејзиниот димер на целобиоза. Целобиазата ги одвојува целобиозите во два глукозни молекула. Целобиозите јако ја инхибираат активноста на обете ендо- и егзоглуконаза, така целобиазата е неопходна во целулазниот комплекс. Целулазите се наоѓаат во сите царства, но најмногу во *Fungi* и *Prokaryotae* [13].

**1.2. Комерцијални пектинолитички ензимски препарати**

**1.2.1. Состав**

Ензимите се протеини составени од најмногу до 20 аминокиселини [14]**.** Активните компоненти на ензимите се составени од биолошко активни протеини. Овие протеини имаат многу комплексна структура и може да бидат врзани со метали, карбохидрати и липиди. Модел на ензим-пектиназа упатува на комбинација од најмалку шест различни ензими [15]. Во принцип ензимите во пектиназа се пектин-метилестераза (3.1.1.11), пектин- лиаза (4.2.2.10), и полигалактуроназа (3.2.1.15)[16].Пектиназата се продава во форма на прав или течна [17].

**1.2.2. Својства**

Ензимските препарати може да се состојат од цели клетки, делови од клетки, или ослободени клеточни екстракти од употребениот извор. Активните компоненти имаат познати молекулски тежини во опсег од 12.000 до неколку стотина илјади [16]. Eнзимите може да бидат во течна, полутечна, или сува форма. Ензимите, а особено пектиназата се лесно растворливи во вода, а практично нерастворливи во алкохол, хлороформ и во етер. Течните се обично во воден раствор, имаат многу од истите својства од водата, со точка на вриење незначително над 100 0C. Сувите препарати се бели до темножолти, а течните обично од темножолти до темнокафени.

 Поедините препарати општо се карактеризираат со функционалностa и активностa подобро отколку со својствата на производот. На пример, пектиназата го хидролизира пектинскиот молекул [18]. Бојата на препаратите може да варира од практично безбојна до темнокафена [16].

**1.2.3. Производство**

 Ензимите се произведувале со клеточен анаболизам, природно случување на биолошките процеси на правење покомплексни молекули од поедноставни единки. Изворот на организми за прехранбената обработка вклучува бактерии, габи, виши растенија и животни [17]. Ензимите може да бидат екстрахирани од даден извор на организам со различни методи [14]. Најмногу од организмите што произведуваат комерцијални пектинолитички ензими се карактеризираат габите од некој сорти *Aspergillus niger,* одгледувани со контролирана ферментација [19].

 Изолација на ензимите од нивните интрацелуларни извори обично започнува со одвојување од средината, вообичаено со физички средства како центрифугирање и сортирање според специфичната тежина. Клеточните sидови на организмите се раскинуваат со механички процес на хомогенизација. Екстрацелуларно производство каде што ферментацискиот организам излачува ензими во форма која може сигурно да се изолира. Било како, техниката на јонска измена може да биде употребена за прочистување на екстрацелуларните производи [20]. Последното прочистување е со центрифугирање и адсорпција со соодветен атсорбент [21].

**1.2.4 Специфични употреби**

Ензимите имаат многу варијанти на употреба [22].Особено, пектиназата е употребувана обично за деполимеризација и деестерификација на растителните пектини во овошјето како што се: јаболка, лимони, портокали, цреши, грозје, домати и др.. Примената на пектиназа овозможува намалување на губитоците и енергијата, употребена на единица од производот, подобрување на аромата и бојата, појачување на бистрината, зголемување на приносот на овошен сок и др. [14, 17].

**1.2.5. Комерцијални пектинолитички ензимски препарати**

 **кои се користат за овошна обработка**

Од раните 1950-ти пектиназите биле користени во обработката на овошјата за добивање бистри или стабилни матни сокови, овошни нектари, каши и концентрати. Тие обезбедувале подобра екстракција на сок и други сакани соединенија од клетките, со пократко и поефективно време на пресување. Тие исто така го разбиструвале сокот со брзо разбивање на големите полисахаридни единици, го намалувале вискозитетот на сокот и ја подобрувале стабилноста и филтрабилноста на производот.

Времето на обработка и вискозитетот може да биде намален со употреба на погодни ензими. Зависно од овошјето или зеленчукот, производот и процесните барања, специфичните ензими може да се употребат за мацерација и постигнување на бистрината на сокот [23-27].

 Mногу сокови се добиваат со механичко дробење и пресување на пулпа од каде што се добива матна мешавина која содржи клетки и делови од клеточни sидови во течноста. Пресувањето на овие пулпи и разбиструвањето на добиените сокови може да биде тешко ако е присутно големо количество пектин. Во добиениот сок со дробење и пресување, растворливиот пектин во течна фаза го зголемува вискозитетот, додека во деловите од пулпата пектинот е ограничен од хемицелулоза и целулоза и е задржан во желирана маса. За подобрување на пресувањето, рандманот на сок, вискозитетот и разбиструвањето, пектинестераза и полигалактуроназа, со или без пектин-лиаза се типично употребувани за разбивање на пектините и желираните делови. Разбиструвањето бара отстранување на матните честички, и во соковите од јаболко овие биле идентификувани како протеин-полисахаридни комплекси. На рН 3,5 јадрото од комплексот е протеин кој носи позитивно полнење, а оние обвитканите со пектини и други јаглехидрати носат негативно полнење. Пектиназите може да деградираат дел од пектинското обвиткување на откриените области од позитивното јадро, правејќи коагулација и таложење на комплексите со електростатска интерактивност [28, 29]. Овој механизам на ензимско таложење е прикажан на Слика 2. Ова исто така дозволува ефикасна употреба на желатин и бентонит како помош за отстранување на матнежот.

 Со цепење на пектинот се добива намалување на вискозитетот, зголемување на брзината на таложење и олеснување на филтрирањето.

 Ензимска мацерација од овошје и зеленчук се употребува за производство на нектарини и концентрати. Таа е наменета за производство на мазен производ кој содржи суспензија од цели, слободни клетки. Ендополигалактуроназа и пектин-лиазните ензими се најупотребувани обично во отсуство на хемицелулазна или целулазна активност. Целта е цепење на sидовите на меѓуклеточната средна ламела. Најефективна мацерација е со пектинестераза која ќе го претвори вискозитетот на сокот во ретка течност, но сепак делови од клеточниот sид уште ќе останат цели.



**1.2.6. Комерцијални пектинолитички ензимски препарати**

 **кои се користат во винарската индустрија**

Пектинолитичките ензимски препарати почнале да се користат во обработка на грозјето за добивање вино во раните 1970-ти и најмногу за подобрување на приносот на сок од изгмеченото грозје и олеснување на бистрењето на сокот. Кога грозјето е термовинифицирано, ензимите мора да бидат додадени после ладење. Најмногу пектиназите за грозје и обработка на вино содржат пектинестерази и ендо- полигалактуроназни активности, а може исто така да содржат пектин-лиази и протеази или протопектинази. Во поново време ензимските компании ги модифицирале пектинолитичките препарати со додавање мали количества целулазни и хемицелулазни ензими за да би се постигнало поцелосно разбивање на клетките и на овошната структура [25]. Ензимите за мацерација може да бидат употребени за делумна или целосна екстракција од овошјата во релативно краток временски период.

Комерцијалните ензимски препарати се разликувале во нивните пектиназни концентрации и странични активности. Секоја формулација се разликувала од условите на екстракцискиот капацитет [30].

Примената на пектинази за бело и црвено грозје, мора да има економски олеснувања со зголемување на вкупниот рандман од слободен проток на сок, намалување на времето за пресување, добивање брзо разбистрување и помалку талог, и олеснување на филтрацијата [6, 23, 27].

Во правењето на бели вина, важните избори се прават пред алкохолната ферментација, затоа што потоа нема можност за поправки или дотерувања. Кога еднаш ќе започне алкохолната ферментација, потенцијалниот вкус од бели вина е веќе во голема мера оформен. Исто така било сугерирано дека со примената на пектинолитички и мацерациски ензимски препарати за црвена шира би ја забрзала и зголемила екстракцијата на боја и феноли од црвените грозја.

Пектинолитичките ензими понекогаш биле штетни за црвеното вино поради антоцианазната активност, која била присутна во некои препарати како штетна странична активност [31, 32]. Денешните трговци вовеле мацерациски ензимски препарати што се направени за производство на црвено вино. Овие препарати се мешавина од пектин- лиаза, пектин-метилестераза, полигалактуроназа, хемицелулаза, целулаза, и протеаза, но тие немаат глукозидазна активност што е штетна за антоцианите. Мацерациската активност ја пробива клеточната структура на лушпата од грозје и помага во ослободувањето на антоциани и копигментациски фактори.

Употребата на пектинолитички ензими во производството на црвено вино може да предизвика зголемување на полимерните пигменти, а ова може или не мора да биде проследено со намалување на мономерните антоциани и на густината на бојата на виното [33, 34].

Количеството на екстракцискиот сок и екстракцијата на соединенија кои се присутни главно во лушпата како антоциани, феноли, калиум и ароматични соединенија се зголемени со зголемувањето на времето на контакт со лушпата пред пресување. Со кратко време на контакт со лушпата, пектиназите може да го зголемат рандманот на сок без значајно екстрахирање на флавoноидните феноли од лушпата, а додека со подолга мацерација, екстракцијата на феноли е зголемена [6]. Исто така било најдено дека за едно дадено време на контакт со лушпата, ензимскиот третман екстрахира повеќе вкупни феноли отколку контролниот без ензим. Ензимски третираните вина имале појака густина на боја отколку контролните, поради појаката пигментна екстракција, но оваа разлика меѓу третманите била намалена со зголемувањето на времето на контакт со лушпата [5].

Екстракцијата на боја со пектинази во почетокот на првите 6 до 8 часа била бавна, исто како ензимското разложување на пектините од лушпата, затоа ензимската мацерација за црвени вина треба да биде дозволена да напредува најмалку за ова време, (6 до 8 часа) под саканите услови, пред инокулирање со квасец [27].

Активноста на пектинолитичките ензими се намалува на ниско рН на ширата и релативно ниски температури, традиционално употребувани за време на обработката на грозјето. Натамошното кочење е предизвикано со зголемување на содржината на добиениот етанол за време на ферментацијата, како и ослободувањето на големо количество феноли.

Фенолните соединенија во црвените вина се екстрахираат од лушпата за време на мацерацијата и ферментацијата кога има контакт помеѓу сокот и грозјето. Специфичните пектинази се употребувале за време на мацерацијата за да ја зголемат екстракцијата на интрацелуларните соединенија. Интрацелуларните соединенија, екстрахирани благодарение на ензимските активности, може да ги имаат следниве влијанија: зголемување на интензитетот на бојата, стабилност на бојата, подобрување на екстракцијата на арома и танини и др..

На грозје од сортата *пино ноар* биле испитувани погодностите од пектиназа на екстракцијата на боја и стабилноста [35]. Бојата останала стабилна по 18 месеци во ензимски третираното вино, во споредба со контролното.

Зголемено ослободување на фенолните соединенија што биле врзани во клеточните sидови било успешно со средства за ензимски третман со деградирачки ензими. Комерцијалните ензимски препарати со пектинолитички, целулолитички и протеолитички активности поединечно или во мешавина се одговорни за оваа цел.

Ресвератрол е јак антиоксидант, присутен во лушпата од грозје која има потенцијал да биде ослободен во ширата за време на мацерацијата под дејство на пектиназите. Еден тим во Австралија испитувал со комерцијални пектинази на грозје од сортата *шираз* за време од 6 дена мацерација, потоа ја анализирале концентрацијата на изомерот на ресвератролот во виното [36]. Ензимски третираното вино содржело 21% и 16% повеќе од транс- и цис-ресвератрол соодветно. Според овие автори, користењето на мацерациските пектинази го подобрувале здравјето и нутриционистичките вредности на црвеното вино од сортата *шираз.*

Употребата на пектинази за време на мацерацијата во црвените грозја е многу корисно за пресувањето и филтрациските операции. Како прво, ширата е помалку вискозна благодарение на деградацијата на пектините, па притисокот применет на грозјето за пресување може да биде понизок, а поради тоа се намалува ризикот од прекумерна екстракција од зелените и сурови танини од семките. Подобрената филтрабилност вообичаено значи намалување на филтрациските помошни средства, за кои е добро познато дека може да отстранат дел од некои корисни соединенија во виното.

Проби на лабораториска (А) и комерцијална (Б) опрема биле извршени за процена на ефикасноста на пет комерцијални ензимски препарати во обработката на грозјето во шира [37]. Резултатите покажале зголемување на вкупниот рандман на шира на опремата-А 8,5%, а на опремата Б-4,9%.

Бели шири од грозје од осум различни вида биле третирани со пектинолитички ензимски препарати[3].Овие третмани довеле до зголемување на вкупните сокови приноси, бистрината на виното, филтрабилноста, винскиот квалитет, како и количеството на исталожени цврсти тела.

Со испитување на ефектот на употребата на четири типа пектинолитички ензимски препарати на квалитетот на црвено вино, се добило обогатување со фенолни соединенија и подобрен визуелен аспект на виното, чија стабилност се разгледувала за време на складираниот период [38].

Ефектот од претферментациската ензимска мацерација на антоциани, феноли, боја и параметри на боја биле испитувани во вината на *пино ноар* [28].Вината биле направени од шира на *пино ноар* која била мацерирана 12 часа на 20оС со комерцијален ензимски препарат, со и без додавање на SO2. Вината произведени со ензимска мацерација имале зголемен видлив интензитет на боја кој одговарал на густината на бојата и полимерните пигменти. На крајот од ферментацијата, ензимски третираните вина имале повеќе полимерни пигменти, а помалку мономерни антоциани отколку ензимски нетретираните вина.

Испитувањата на примената на комерцијален ензимски препарат за време на мацерација за алтернативни процеси на 7 поединечни вида на вината *порт,*  довело до зголемување на приносот на шира (до 6%), зголемување екстракцијата на боја (до 40%), а и брзината на филтрација на виното била значително побрза во ензимски третираните вина [2].

Проучување на ефектот на употреба на пектинолитички ензими на боените карактеристики и фенолни соединенија од млади црвени вина, направени од *тинто фино* покажало повисоко ниво на вкупен катеин отколку контролното вино. Некои вина покажале поголем интензитет на сино, а некој на црвено зависно од видот на ензимскиот препарат, а контролното вино имало повисок тоналитет на жолто [39].

Направена е споредба на неколку комерцијални пектинолитички ензимски препарати, применети во технологијата на вино за поефикасна екстракција на пожелни црвени пигменти од грозје *блауфренкиш* и други фенолни соединенија кои се сигурно во растителните клетки и може да бидат побрзо ослободени со дејството на пектинолитичките ензими [40]. Максималното ослободување на пигментите од црвеното грозје *блауфренкиш* се случило во 4 или 5 дена после додавањето на пектинолитички ензимски препарати за време на претферментацијата. Во контролниот примерок без ензимски препарат требало 7 дена за постигнување на истиот ефект, т.е. 2-3 дена повеќе отколку примероците со ензимски препарати. Освен тоа, времето на филтрација било десет пати пократко од контролниот примерок, а брзината на таложење била два до три пати побрза споредено со контролниот примерок.

Како што е прикажано низ различните примери на употребени комерцијални пектинолитички ензимски препарати произведени од чисти култури на микроорганизми, пред сè од *Aspergillus niger* имаат широк опсег на погодности во производството на вино. Тие делуваат на низок опсег на делување (вообичаено 2-3 g/hl) со многу видливи резултати на квалитетот на виното.

**1.2.7. Странични активности на комерцијални**

 **пектинолитички ензимски препарати**

 Индустриските пектинолитички ензимски препарати се најобичен екстрацелуларен материјал произведен во контролирана ферментација во ферментори под аеробни услови од чисти култури (на прехранбен степен) микроорганизми, особено фунги од *Аspergillus niger*или *Trichoderma**lougibrachiatum*.Производителите ги оптимизирале условите на ферментација за секоја посебна ферментација, а припремената средина и супстрати може да се разликуваат меѓу производителите. На пример, средина богата со пектин ќе ги предизвика микроорганизмите да излачуваат пектиназа (пектинолитички ензими) во средината.

 Ензимите добиени со ферментацијата се двојат од клеточниот и нерастворливиот материјал со филтрација или центрифугирање, а добиената сурова течност потоа се концентрира, вообичаено на ниска температура со испарување под вакуум. Од концентрираната течност вообичаено се врши таложење на ензимите со соли **(**Na2SO4, (NH4)2SO4**,** NaCl, илиNa3PO4**)**, проследено со сушење. Вака добиените суви, прашкести ензимски препарати се сурови, и освен што содржат различни пектинази, тие содржат вообичаено и различни други секундарни (странични)активности како глукозидази, естерази, протеази, хемицелулази, и целулази. Меѓу овие активности некои се многу непожелни во енологијата, како цинамилестераза и антоцианаза. Цинамилестеразата во добивањето на розе и бели вина, може да произведе несакани соединенија како винил-феноли, тоа се испарливи феноли кои му даваат на виното непожелни фармацевтскимириси.Употребата на непрочистени ензимски препарати кои содржат антоцианази може да ја дестабилизираат винската пигментација и да предизвикаат губење на бојата во розе и црвените вина. Комерцијалните пектинолитички ензимски препарати, добиени од различни производители, може да бидат со големи разлики меѓу активностите [38].

 Во иднина подобрувањето на чистотата и специфичниот состав на комерцијалните ензимски препарати може да бидат добиени со генетско инженерство од фунгални видови [41, 42], a подалечна можност со генетска технологија е да се преместат гени за појавување на специфични пектинолитички ензими во квасците за вино [43].

 Променливите и контрадикторни резултати од пектинолитичките ензими, употребени за екстракција на боја и стабилност на црвените вина биле препишани на страничните активности во ензимските препарати, а како најзначајна е β-глукозидазата. Оваа активност била прва одредена во фунгален ензимски екстракт од *Аspergillus* од Huang (1955)[44], каде што било одредено дека има значаен ефект на обезбојување на пигментните екстракти од различно овошје, вклучувајќи и грозје. Активноста на обезбојување се разликувала меѓу овошјето, зависно од различниот состав на антоциани. Откако, β-глукозидазата била изолирана од комерцијални пектиназни препарати во многубројни примери [41, 45-47], потоа била идентификувана во комерцијалните сокови и обработени вина со пектинази [48, 49].

 β- глукозидазата ја отцепува глукозата од положба 3 во антоцианите, создавајќи антоцианидин и глукоза, следено со спонтана трансформација од нестабилен аглукон во безбојна халкон форма **(C6H5 · CH : CH· CO· C6H5),** според даден механизам [50].

 Во постапката за проверка на оваа странична активност било подобро да се користат овошни сокови отколку стандарден супстрат *р*- нитрофенилглукопиранозид [48]. Tоа е интересно да се забележи дека оваа анализа не е во добра врска со стандардните анализи за глукозидазна активност, кои користат *р*-нитрофенилглукопиранозид супстрати, но анализите со овошни сокови подобро ги одразуваат ефектите кој ензимите ги имаат кога се употребени за обработка на сок или вино.

 На обработка на комерцијално црвено грозје со ензими кој имале β-глукозидазна активност и ослободени ензими од тоа, биле правени проверки на β-гукозидазна активност [31]. Ензимите кои биле ослободени од β-гукозидазна активност не покажале зголемување на екстракцијата или стабилизирачки својства на бојата, споредено со контролата. Оние ензими кои покажале намалување на мономерните антоцианин-3-глукозиди исто така произвеле зголемување на полимерните пигменти.

 Друга странична активност која може да биде присутна во пектиназите е фенол естераза [51]. Ефектот од оваа активност на црвената боја на виното била многу важна. Нивното присуство најчесто ги намалувало хлорогенските киселини, а ги зголемувало кофеинските киселини [38], или ги намалувало естрите на винска киселина од грозје, проследено со зголемување на нивните слободни киселини [31].

**Глава 2. Грозје**

**2.1. Грозје и структура на зрно од грозје**

Грозјето е овошје кое расте во гроздови (група зрна) од неколку до стотина, на многу годишно и листовито растение-винова лоза од родот *Vitis.* Тоа може да се јаде сирово или се користи за правење џем, сок, желе, оцет, вино, суво грозје, масло од семките од грозје и др..

Постојат податоци дека виновата лоза се одгледувала во стариот Египет. Научниците верувале дека старите Грци, Фениканци и Римјаните одгледувале грозје за јадење и правење вино. Подоцна, одгледувањето на грозје се проширило во Европа, северна Африка, и најпосле во САД. Грозјето може да биде темноцрвено, црвено, црно, темноплаво, жолтозелено, жолто или виолетово.

Според FAO (Food and Agriculture Organization, 2008), 75.866 km2 од светот се под лозја, околу 71% од светското грозје е произведено во вино, 27% како свежо овошје, и 2% како суво овошје. Најголеми светски производители на грозје се : Италија, Франција, Кина, САД, Шпанија, Турција, и др., а најголеми светски производители на вино се: Шпанија, Франција, Италија, Турција, САД, Иран, Романија, Португалија и др..

Според податоци од Министерството за земјоделство, Македонија има околу 25.000 хектари лозја (250 km2), од кој 70% се користат за производство на винско грозје, а 30% за трпезно грозје. Во последниве петнаесет години од македонските лозја се произведуваат околу 184.000 тона винско грозје, од кои винариите прават од 80 до 120 милиони литри вино годишно.

**2.1.1. Механички и хемиски состав на грозјето**

Под механички состав на грозјето се подразбира уделот на одделни делови на гроздот во суровината од која започнува производството на вино [52]. Тука имаме:

* 2 до 8% петелки;
* 92 до 98% зрна.

Просечен состав на зрната е:

* 5 до 11% лушпи;
* 80 до 90% месо;
* 2 до 5% сем**к**и.

На Сл. 3 се дадени соединенијата што се присутни во зрното од црвено грозје кои се важни за квалитетот на виното. Од тука се гледа важноста на сите делови (лушпа, месо и семки) на зрното од грозје.



На Сл. 4 е дадена структурата на зрно од грозје. Секој од овие делови на гроздот содржи одредени хемиски соединенија кои влијаат врз квалитетот на виното.Така, петелките содржат големи количества полифеноли (најважен е леукоцианидол-полимер танин и d-катеин), кој се екстрахираат во текот на ферментацијата (затоа петелките треба да се одвојат после мелењето).

Лушпата (кај сорти со ситни зрна ја има во поголем процент) содржи значително помалку танини отколку петелките. Црвените сорти имаат повеќе од ова соединение (танин) отколку белите, како и антоциани во облик на гукозиди на црвената боја. Во белите сорти присутни се флавони. Во лушпата може да има и етерични масла, виши алдехиди, виши алкохоли, кетони, естери на вишите масни киселини и др.. Сите овие се ароматични материи.



Семките на надворешната површина содржат повеќе танински материи од петелките и лушпата (2 до 4%) кои лесно се екстрахираат и преминуваат во виното. Бидејќи семките содржат и одредено количество масло кое е непожелно во виното, мора да се внимава во текот на дробење на грозјето да не дојде до кршење на семките [52].

Месото е составено од гроздов сок кој е опкружен со тенки пектинско-целулозни обвивки. Од количеството на месо зависи и искористувањето на грозјето. Вообичаено од 100 kg грозје можно е да се добие 60 до 80 литри шира. Ширата содржи речиси еднакви количества гликоза и фруктоза и многу малку сахароза (1 до 3 g/l) и органски киселини (4 до 8 g/l), од кои винска (4 до 6 g/l), јаболкова(1 до 2 g/l) и лимонска ( 0,3 до 0,7 g/l)**.** Трулото грозје содржи значително повеќе лимонска киселина која заедно со глуконската киселина се создаваат со метаболизмот на габата *Botrytis cinerea* [52].

**2.2. Структура на клетката на лушпа од грозје**

На Сл. 5 е дадена структура на клетката на лушпа од грозје. Клеточните sидови се направени од комплекс полисахариди, наречени пектини и овие соединенија ја обезбедуваат структурата и цврстината на клетките. Во клетката е цитоплазмата која содржи јадро, пластиди и ензимски системи, како и вакуоли во кои има шеќери, киселини, антоциани и танини. Пектините се концентрирани во sидовите на средните ламели меѓу клетките, а полимерите на галактуронските киселини често се високо метилирани. Рамноза, арабиноза, галактани и арабиногалактани може да бидат вклучени во пектинските материи. Клеточните sидови имаат повеќе хемицелулозни и целулозни соединенија. Споредниот клеточен sид е најмногу пектин со нешто лигнин, додека основниот клеточен sид е најмногу застапен со целулозни влакна, наречени микрофибрили, во средина од пектини, хемицелулози и протеини.

Екстракцијата очигледно бара sидовите на средната ламела да бидат деградирани за да ги ослободат клетките, а клеточните sидови да бидат раскршени за да дозволат содржината во вакуолите да биде екстрахирана, или дифундирана во виното. Ова може да биде постигнато со употреба на механичка мацерација, топлина, хемикалии како SO2, или со употреба на пектинолитички ензими.



**2.3. Пектини во грозјето**

Пектинот е веројатно една од најкомплексните макромолекули што се најдени во природата.Тој е хетерополисахарид кој се наоѓа во средната ламела и основниот клеточен sид од повисоките растенија.

 Пектините функционираат како „лепак“ кој ги држи заедно другите полисахариди во клеточниот sид, како целулоза и хемицелулоза (т.е. ксилоглукан или глукуронарабиноксилан), и протеини, такви како што е хидроксипиролинот, дадени на

Сл. 6.



Два антипаралелни пектински синџира може да бидат кондензирани во клеточниот sид со нормално врзување со Ca2+ јони за формирање на „чворни зони“. Во некои видови, пектините може да бидат вкрстено врзани со други пектини или нецелулозни полисахариди со естерски врски со дихидроксицинамик-киселини, такви како што е диферулик-киселина [8].Во растенијата, пектините се присутни во сите состојби од развојот.

Количеството на пектин во овошјето зависи од многу фактори, посебно од видот на овошјето и од степенот на зрелост. Во зрело винско грозје е најдено од 0,2 до 3% пектин [1].

На Сл. 7 е дадено шематски претставување на пектин. Тој има три главни компоненти [53, 54] :

* Хомогалактуронан (HG) се неразгранети молекули, збиени во синџир од галактуронски киселини. Тие се во области познати како „smooth“ (рамна).
* Рамногалактуронан - I (RG-I). Главен синџир, збиен од наизменично рамноза и галактуронска киселина, носи странични синџири од арабинани и арабиногалактани. Тие се во области познати како „hairy“ (влакнести).
* Рамногалактуронан - II (RG-II) има многу комплексна структура која не може да биде хидролизирана со ензими.

Овие три компоненти се наоѓаат во клеточните sидови, поврзани со киселински врски за да формираат пектин. Вкрстените врски меѓу пектинските синџири (јонски, електростатички, и др.) ја одредуваат порозноста на клеточниот sид.



Во винарската индустрија при преработка на грозјето во вино, овие пектински материи, смолести и слузести материи во ширата и виното, како „заштитни колоиди“ го отежнуваат природното бистрење и филтрирање на виното, а како главна состојка на клеточните sидови ја спречува дифузијата на фенолни компоненти и ароми во ширата. Кога се во прашање пектините најдено е решение во примената на комерцијални пектинолитички ензимски препарати. Хемиското делување на ензимските препарати се состои во тоа што пектинолитичките ензими го ослободуваат пектинот од несаканото заштитно влијание, па доаѓа до забрзано бистрење на виното т.е. многу брзо и темелно разбивање на клеточните sидови на зрната од грозје, цепење на пектинот и големо намалување на вискозитетот на ширата.

**2.4. Полифеноли во грозје и вино**

Основна фенолна група е ароматски бензенов прстен со најмалку една хидроксилна група**.** Во грозјето има многу соединенија што ја содржат оваа многу реактивна фенолна група, а тие се екстрахираат во винотои поради тоа имаат големо влијание врз карактеристиките на виното, а особено на црвеното вино.

Фенолни соединенија во грозјето вклучува голема група од неколку стотици хемиски соединенија, познати како **полифеноли**. Фенолните соединенија во грозјето се присутни главно во семките и лушпата [55]. Присутните феноли во лушпата од грозје се одделени во вакуоли, врзани со протеини на внатрешното лице од цитоплазматичната мембрана што ја обвиткува вакуолата (тонопласт), или врзани со гликозидни врски со полисахаридите во клеточниот sид, и се ослободуваат кога клетките се разградуваат [56, 57]. За време на созревањето, фенолите од семките се селат од вакуолната течност спрема дебелите sидови од надворешната епидерма каде што тие се достапни за екстракција. На Сл. 8 се дадени екстрактивните соединенија, присутни во црвените вински грозја и нивната претпоставена локација.

Поголем број од различните типови фенолни соединенија биле одредени во грозјето и виното. Овие соединенија може да бидат општо категоризирани во групи кои се разликуваат според бројот и ориентацијата на фенолните субединици во молекулите. Бројот и позицијата на хидроксилните групи што се прикачени на ароматската структура ја менува реактивноста на фенолните соединенија. Kennedy *et al*. (2006)[58] и Cheynier *et al.* (2006)[59]одредиле голем број вински феноли.

Вината и грозјето содржат голем број полифенолни соединенија што се класифицирани во две главни групи: нефлавоноиди (оксибензоева и оксициметна киселина и нивни деривати, стилбени и фенолни алкохоли) и флавоноиди (антоциани, флаван-3-ол мономери и полимери, флавоноли и дихидрофлавоноли) кои играат главна улога во енологијата [60].Нефлавоноидните феноли се важни феноли во гроздовата пулпа и во дабовото дрво, додека флавоноидните феноли се важни во лушпата, семките и петелките од грозјето [61].Овие соединенија придонесуваат за сензорските карактеристики на виното, посебно бојата, аромата и трпкавоста, како и за разликите помеѓу црвените и белите вина. Црвените вина ги содржат сите погоре спомнати феноли, додека белите вина содржат главно фенолни киселини и незначителни количества флаваноли. Овие соединенија се важни во поглед на визуелниот квалитет на белото вино.



Во црвените вина, танините и антоцианите се најважни фенолни класи. Танините придонесуваат за осетот во уста на вината, но тие исто така формираат пигментни полимери во здружување со антоциани и формирање слободни пигменти кои даваат црвена боја за подолг период.

**2.4.1. Нефлавоноиди**

Од нефлавноидите, доминанти компоненти се дериватите на хидроксициметните киселини кои се присутни во грозјето и од таму преминуваат и во виното [63]. Од групата на нефлавоноиди, во грозјето и виното, во помали концентрации се присутни и хидроксибензоеви киселини [64]. Галната киселина е доминанта хидроксибензоева киселина. Таа има многу низок редокс-потенцијал и лесно се оксидира во вината, до формирање хинон и водороден пероксид кој е јак оксидант. Галната киселина е најдена во семките од грозје во комбинација со (-) епикатеин во форма епикатеин-3-О-галат, и таа може да придонесе за формирање кондензирани танини во грозјето. Хидроксибензоевите киселини може да се добијат во црвените вина како деградациски производи на антоцианите. Концентрациите на хидроксибензоевите киселини во црвените вина се мали, особено споредени со количествата на другите присутни феноли.

На Сл. 9 се прикажани хидроксициметните киселини најдени во *Vitis vinifera.*

Хидроксициметни киселини, деривати од *p-*кумарна, кофеинска, ферулна и синапна киселина, постојат во грозјето како естри на винска киселина, но може да бидат најдени во нивните слободни форми во виното поради ензимски кисели хидролизи за време на винификацијата [65, 66]. Иако хидроксициметните киселини се главни феноли што се присутни во гроздовото месо, најмногу од нив поединечно се присутни под нивото на нивниот сензорски праг во вината [67].

Кафтарната киселина e главен супстрат за ензимска оксидација во виното. Низ споени оксидациски реакци со антоциани, кафтарната киселина може да придонесе за антоцианска оксидација и виното да потемни [68].

Белите вина содржат релативно мали количества флавоноидни феноли затоа што тие се направени со минимална екстракција од лушпата и семките**,** така што нивната фенолна содржина вклучувала најмногу нефлавоноидни феноли.

Количествата од хидроксициметни киселини се големи во слободниот проток на сокот, бидејќи тие се главни феноли што се присутни во месото од зрната. Во лушпата се присутни во помали количества.



**2.4.2. Флавоноиди**

Флавоноидите се најважна група на феноли во грозје и виното. Овие соединенија содржат две фенолни групи (прстени А и В) поврзани со кислороден прстен, формирајќи C6-C3-C6 група. Флавоноидите постојат во олигомерни и полимерни форми кои се разликуваат според степенот на оксидација на централен хетероцикличен прстен, бројот на хидроксилни и метоксилни групи кои ги имаат.

Одговорните флавоноиди за бојата, осетот во уста и карактеристиките на созревање на црвеното вино, ги вклучуваат следниве важни групи: флавоноли (кверцетин), флаваноли (катеин, епикатеин), танини и антоциани.

**2.4.2.1. Антоциани**

Антоцианите кои се наоѓаат во вакуолите од лушпата на црвено грозје се ослободуваат во виното за време мацерацијата.

 Тие се одговорни за бојата во црвените вина и тие се вклучени во фенолните полимеризациони реакции кои се случуваат за време на одлежувањето. Екстракцијата и менаџментот на антоцианите во млади вина е значајно за квалитетот и стилот на црвените вина [69-71].

Полимеризацијата може да влијае врз сензорскиот квалитет на пигментите со зголемување на стабилноста на бојата и промена на спектарот на бои од светлоцрвена до темноцрвена.

Бојата од антоциани е важна сензорска особина на црвеното вино затоа што постои позитивна корелација помеѓу црвената боја на виното и видливиот вински квалитет [70, 71].

На Сл. 10 прикажани се антоциани најдени во *Vitis vinifera*. Aнтоцианите се растворливи во вода и се многу постабилни од нивните матични агликони, антоцианидини, кои немаат поврзани шеќерни групи и не се наоѓаат слободни во грозјето или виното [72]. Тие имаат [***–О–***]шеќерна група на положба [**3**] која дава значајно подобра стабилност на нив [72].Антоцианите појавуваат црвено обојување поради апсорпција на светлината во зелениот дел од спектарот на околу 520 nm. **Малвидин - 3 – глукозид**  е доминантен присутен антоциан во видовитеод *Vitis vinifera*. Други агликон молекули на антоцианите се пеонидин, петунидин, цианидин и делфинидин. Најзастапени се 3-моноглукозидите, а пристуни се и 3-ацетилглукозиди и 3-p-кумароилглукозиди. Исто така, идентификувани се и 3-кафеоулглукозиди.

Во младите црвени вина бојата зависи главно од мономерните антоциани [73].Со стареење на виното се случуваат полимеризациските реакции, а полимерните пигменти добиваат зголемена одговорност за бојата на виното. Реакциите вклучуваат антоциански прогресивни промени на бојата на виното, со неговото стареење [74, 75]. За време на одлежување на црвените вина, нијансата на винската боја преминува према покафени бои, а густината на бојата опаѓа. Промените се приметиле со опаѓање на вредноста на апсорбенсот на 520 nm, и во зголемување вредноста на апсорбенсот на 420 nm [61].

****

**2.4.2.2. Флаван-3-ол мономери**

Флаван-3-ол мономерите се присутни во семките од грозје [76, 77].Тие се изомери на катеинот и епикатеинот. Може да постојат во четири структурни изомери поради асиметричните јаглероди С2 и С3. Од нив само **(+)** катеин и **(-)** епикатеин се важни форми во грозјето и вината. Флаван-3-ол мономерите се слабо горчливи и полимеризираат во форма на процианидини и кондензирани танини во виното [78],но не се класирани како танини, затоа што не ги таложат протеините [55, 79-81]. На овие соединенија им е посветено многу внимание во поново време, затоа што нивниот потенцијал придонел за човечкото здравје поради нивните антиоксидативни, антимикробни, антивирусни, и антиканцерогени карактеристики [82]. Нивната екстракција и улога во виното била интензивно испитувана. Долго време на мацерација, високи температури за време на мацерација и високо ниво на алкохол ја зголемува екстракцијата на овие мономери од грозјето во виното [83-85].

**2.4.2.3. Проантоцианидини (танини)**

Проантоцианидини се полимерни синџири од катеини, со молекуларна маса од 500 до 3000 g/mol, кои се способни за вкрстено врзување на протеините [86].

Проантоцианидините се исто така познати како олигомерни проантоцианидини, леукоантоцианидини, кондензирани танини или танини. Танините се состојат од повеќекратен флаван-3-ол(или флаван-3,4-диол) мономери (од 2 до 60 мономери) поврзани заедно, типично преку С4 до С8-врските и помалку преку С4 до С6-врските. Полимеризацијата е катализирана со ниско *pH* и може да биде дополнета со вкрстено врзување со ацеталдехид. Во средно кисели средини во виното, овие врски може да се раскинат и лесно да се прегрупираат, правејќи големи разлики во големините и структурите [87]. Тие реагираат со многу феноли и антоциани, и се таложат со протеини. Овие комплексни полимерни танини се постабилни на оксидациска деградација, споредена со нивните мономерни состојки [86]. Танините од лушпата, обично имаат поголема полимерна должина отколку танините во семето. На пример, танини од лушпата во *пино ноар* биле најдени со среден степен на полимеризација (mDP) од околу 40 мономерни единици [88], а во семките од околу 2 мономерни единици [88-90]**.**

Катеин, епикатеин, епикатеин галат и епигалокатеин содржат главните единици на танините од лушпа, а катеинот е основна единица [89, 91].

Фенолните соединенија, вклучувајќи и танини, може да делуваат како главни почетни супстрати за оксидација, што води према потемнување на виното и губење на дел од аромата или трпкавоста [92].Фенолните соединенија може да претрпат неензимско потемнување со формирање комплекси со метални јони. Потенцијалниот механизам на потемнување со заемно дејство со метален јон може да опфати и бакарна оксидација на фенолите до хинон, кои потоа во полимеризациски реакции формираат кафени пигменти [93, 94]. Улогата на фенолните соединенија во оксидационите процеси и потемнување на виното било повторно разгледувано од неколку групи[95-97]. Проантоцианидините придонесуваат за трпкавоста, горчливоста и чувството во устата на вината.

**Глава 3. Вино**

**3.1. Производство на вино**

Вино е ферментиран сок од грозје, а тоа е кога шеќерот од грозјето ќе биде трансформиран во алкохол. Виното може да биде направено освен од грозје и од друго овошје, но најмногу се прави од грозје.

Од застапените македонски сорти грозје, доминантни се црвеното грозје *вранец* и белото грозје *смедеревка* кои се многу важни за лозарството и производството на квалтетни вина во македонските винарии. Овие две сорти грозје се препорачани и одобрени за производство на вино кои можат да се одгледуваат во Република Македонија врз основа на правилникот за класификација на сорти на грозје за производство на вино [98].

Производството на вино може да се подели во три фази, и тоа:

* Берење и преработка на грозјето;
* Алкохолно вриење (ферментација) на ширата;
* Формирање на правиот квалитет на виното.

**3.1.1. Берење и преработка на грозјето**

Иако берењето на грозјето, во тесна смисла, не спаѓа во производство на вино, сепак тоа не може потполно одвоено да се разгледува, бидејќи со берењето на винско грозје почнува и производството на вино, затоа што квалитетот на виното се раѓа во лозјето, а се формира и завршува во подрум. Времето на берење е многу значајна работа, бидејќи треба да се одреди правата зрелост на грозјето и неговиот квалитет. Тоа се прави врз основа на изгледот на зрната и гроздовите, вкусот на грозјето, како и анализи на грозјето (содржина на шеќер, киселини, и др.). Во поволни временски услови количиеството на шеќер може дневно да се зголемува и за 0.5%.

 Воведен е т.н. индекс на зрелоста (I), кој претставува однос на количеството на шеќер и количеството на вкупни киселини [52]. I=S/A каде што S- количество шеќер, g/l; A- количество вкупни киселини, g/l;

Како што напредува зреењето на грозјето така се зголемува вредноста на индексот на зрелоста (I). Кога вредноста ќе почне да не се менува т.е. останува иста, тогаш е погодно времето за берба. Шеќерот може да се измери наједноставно со сахарометар, а киселините со титрација со NaOH (волуметриски метод).

За да се добие здраво и квалитетно вино, важни се условите под кои се манипулира грозјето, ширата и виното по бербата.

Преработката на грозјето се надоврзува на берењето на грозјето и се состои од гмечење, цедење или пресување.

По бербата грозјето се гмечи, при што доаѓа до ослободување на сокот од зрната, и се двојат петелките. Смесата од сок и останатите делови од грозјето се вика комиње.

При производство на бело вино важно е ослободениот сок да се одвои што побрзо од цврстите делови на комињето за да не поминат оние супстанции од петелките и лушпата во ширата.Тие лесно оксидираат на воздух, а на ширата би и дале темна боја. Ова е особено важно кога се сака од црно грозје да се произведе бело вино.

Издвојувањето на сокот од комињето се изведува во преси. Така се добива самоток кој има околу 60% од вкупното количество грозје. Преостанатиот дел од комињето обично се сулфурира (при производство на бели вина) со околу 5-10 g/hl SO2 како би се намалила оксидацијата на воздухот. Потоа се пресува 2 до 3 пати како би се добило што повеќе шира.

При производството на црвено вино од комињето се одвојуваат само петелките, а сокот со преостанатите делови од грозјето се префрла во резервоари за ферментација (ферментори) и тука се сулфурира со околу 5-10 g/hl SO2. Пред ферментацијата или во текот на ферментацијата во ферменторите од цврстите делови на комињето се екстрахираат обоени материи (антоциани) и танински материи (мацерација). Екстракцијата на овие материи се зголемува со зголемување на концентрацијата на алкохолот. Главната ферментација трае 4 до 7 дена и дури потоа се пристапува на одвојување на сокот кој е во голем дел ферментиран. После одвојувањето на самотокот, преостанатото комиње се пресува. Така од 100 kg комиње се добива околу 66 литри вино самоток и 11 литри вино од пресувањето.

Понекогаш, комерцијалните винарии употребуваат ензими при мелење на грозјето за да го зголемат количеството на вино-самоток. Ензимите многу брзо и темелно ги разбиваат клеточните sидови на зрната од грозје, и сокот полесно се ослободува. Зголемениот самоток ги намалува количините за пресување, така пресувањето е побрзо по ензимскиот третман. Со ензимскиот третман се цепат пектинските материи во ширата и со тоа се олеснува и филтрацијата и се добиваат вина со подобар сензорски квалитет, т.е. побистри, повкусни и постабилна боја. Малите винарии користат мали преси, па затоа со употребата на пектинолитички ензими сите технолошки процеси во правењето на вино се олеснети, временски скратени и поефикасни т.е добивање поквалитетно вино и на крај поголем профит.

Поради сиве овие погодности ние во нашите истражувања употребивме ензимски препарати за да се видат кои се можностите за нивна употреба и вистинските ефекти при добивањето на црвено вино од грозје *вранец* и бело вино од грозје *смедеревка,* како најзастапени во нашата држава, со цел за натамошна ефикасна примена во производството на вина, како во помалите така и во поголемите винарии.

**3.1.2. Алкохолна ферментација на смесата или ширата**

Вриење на ширата т.е. алкохолна ферментација претставува една од основните фази во процесот на производство на вино. Со вриењето на ширата почнува создавањето на виното. Тоа е фаза која настапува после гмечење на грозјето, односно цедење на ширата. Тогаш квасците кои мирувале на покожицата на зрната, доаѓаат во течноста во која е растворен шеќер, почнуваат интензивно да се размножуваат, разложувајќи го шеќерот на разни ниски соединенија, а најмногу на алкохол и СО2. Овие две соединенија се најважни и основни производи на винскиот квасец. Истовремено алкохолот е и основна состојка на виното, односно на секој алкохолен пијалак, добиен со алкохолна ферментација.

Покрај овие основни производи на алкохолната ферментација, се создаваат, во многу мали количества цела низа разни други соединенија, како што се глицерин, оцетна киселина, јантарна киселина и други. Истовремено, настанува одредено количество енергија кое се ослободува во вид на топлина, а делумно ја користат квасците за нивните животни потреби. Текот на винификацијата, количеството и меѓусебниот однос на одделни соединенија, доста се разликуваат, што зависи од многубројни фактори кој влијаат врз текот на винификацијата, односно на создавањето на едни или други соединенија.

Ширата на почетокот многу се заматува, потоа се создаваат меурчиња и се појавува дебела пена која почнува да врие. При тоа температурата пораснува за 10, 20 и повеќе степени. Дебелината на пената и интензитетот на вриењето многу зависи од температурата на ширата, како и од други околности, т.е. квалитетот (составот) на ширата, големината на садот, видот на културата на квасец, аерација, сумпорење на ширата, и.т.н.. Овој процес се вика алкохолно вриење на ширата или алкохолна ферментација.

Познато е дека во ширата при гмечење на грозјето заедно со саканите вински квасци доаѓаат и многу други несакани квасци и разни штетни микроорганизми кои во ширата или виното во одредени околности предизвикуваат несакани процеси (оцетно-кисело вриење, јаболково-млечно кисело вриење, манитно вриење, сулфурводородно вриење и др.).

За правилно одвивање на ферментацијата на ширата се презема соодветно сулфурирање на ширата, по потреба и пастеризација и задолжителна употреба на селектиран вински квасец, како и создавање услови кои му одговараат на винскиот квасец, коишто пак, се специфични за секој конкретен случај.

Квасецот користи енергија од ширата (шеќерот) по пат на дишење и ферментација. За технологијата на виното двете реакции се подеднакво важни. Со дишењето квасецот го разградува шеќерот во присуство на кислород од воздухот и тоа го користи за неговото размножување, а при ферментацијата која се одвива без присуство на воздух, квасецот го користи само шеќерот и енергијата. Разградба на шеќерот :

1. Дишење (во присуство на воздух, аеробна),

**С6Н12О6 + 6О2 = 6СО2 + 6Н2О + 673саl**.

2. Ферментација (без присуство на воздух, анаеробна),

**C6H12O6 = 2C2H5OH + 2CO2 + 33cal.**

Технолошки гледано значајни се и едната и другата фаза. Првата за размножување на квасецот, а другата за ферментацијата. Првата фаза настапува пред и во почетокот на алкохолната ферментација, а другата фаза настапува и продолжува потоа.

Основната разлика во производство на бели и црвени вина е што при производство на бели вина најчесто смесата после гмечењето веднаш се одвојува од цврстите делови на грозјето или се задржува многу кратко, а кај црвеното вино по одреден временски период (мацерација).

Винификацијата опфаќа две појави, пред сè, речиси секогаш истовремени и меѓузависни : мацерација и ферментација.

**3.1.3. Мацерација и видови мацерација**

**Мацерација** е времето или периодот на контакт помеѓу цврстите делови од грозјето (лушпи и семки) и гроздовиот сок. Во текот на мацерацијата се ослободуваат или екстрахираат компонентите (соединенијата) од грозјето.

Овие супстанции се најмногу фенолни соединенија, антоциани и танини, а тие се одговорни за бојата во црвените вина и општо за структурата на виното. Тие се полисахаридни макромолекули, ароматски супстанции и минерални траги. Количествата и односот на овие соединенија е променлив, зависно од составот на грозјето и неговата зрелост. За добра мацерација се прифаќа екстракцијата на повеќе сакани состојки и тоа е неизбежен компромис кој вклучува баланс од спротивставени сили.

Мацерацијата опфаќа :

* Екстракција и мешавина од различни супстанции. Тоа е помогнато со разградба на растителните ткива, пред сè на лушпите од грозје, со природно случување или додадени **пектинолитички ензими** и со механичко нагризување или дробење.
* Комбинација од шира/вино со екстрахирани супстанции. Ова влијае врз релативните односи на супстанците што се присутни во различни фази од мацерацијата.
* Припојување на екстрахираните супстанции на цврстите делови во ширата (талог и квасец). Ова е појава на реапсорбција и следи мало намалување на екстрахираните супстанции во ширата.
* Промена на екстрахираните супстанции. Реакцијата на екстрахираните супстанци со алкохол или со други формирани производи за време на процесот, заедно со промената на редукциската состојба на ширата, води спрема една важна фаза каде што супстанциите се стабилизирани или се губат по една серија од реакции, предизвикани од природни услови или енолошка интервенција.

Според квалитетот на грозјето, неговата зрелост, потеклото, како и типот на вино кое ќе биде произведено, развојот на мацерациските процеси може да се опишат на следниве начини :

* Кратка мацерација;
* Долга мацерација;
* Карбонска мацерација;
* Термомацерација;
* Претферментациска ладна мацерација;
* Долга мацерација комбинирана со ферментација.

**Кратка мацерација** е класичен метод за современи црвени вина со темно- виолетови црвени бои, свежи и атрактивни ароми, со добар вкус и мирис, меки, но тешки, ослободени од некои трпкави или остри вкусови, но со точно количество киселост. Параметрите за квалитет и операциите имаат потреба да го направат тоа за да се разликува според типот на употребено грозје. Зрелоста во принцип влијае врз фенолната содржина и особено на бојата.

Мацерацијата често е помогната со употреба на **пектинолитички ензими** кои помагаат за раскршување на растителните клеточни ѕидови и поради тоа доаѓа до развивање на бојата и различните ароми во виното.

**Долга мацерација** е тип мацерација каде што важна работа е да мацерирањето е доволно долго за да извлече полн потенцијал од грозјето во смисла на производство на високо квалитетни вина. Должината на мацерацијата не е многу разгледувана. Всушност, многу често долгата мацерација е исто така еден ризик, со висока вероватност на создавање проблеми со прекумерно трпкави вина, или со недостатоци во аромата со развивање несакани или намалени ароми.

Долгата мацерација мора да биде користена внимателно, и само со најдобри и зрели грозја. Само тогаш може таа да биде користена за развој на вина со одлични карактеристики. Зрелоста на грозјето е пресудна, посебно за проверка на фенолното количество, но во некој случај и количеството на шеќер треба да одговара.

**Карбонска мацерација** е тип мацерација која користи реакции кои настануваат кога целото грозје е лишено од кислород. Потопено во сулфур диоксид растителните клетки го менуваат нивниот метаболизам од аеробен во анаеробен. Ова предизвикува грозјето да изгуби до 2% од етанолот, цепење на јаболковата киселина и пектините, кое предизвикува ослободување на фенолните супстанции и обоените супстанции од лушпите, и намалување на слободните аминокиселини во корист на протеините. Температурата е многу важна во овој процес и карбонската мацерација нема да функционира на пониска од 25 ⁰С. Стандардна практика да се изврши анаеробна мацерација е 10 дена на 30 ⁰С.

**Термомацерација** е стара моделирана техника уште во користење од некои произведувачи за некои типови вино. Со греење на околу 65 до 75 ⁰С се разградува клеточната структура во грозјето и забрзува појавата на екстракција.

Процесот на греење може да биде применет во целата изгмечена смеса или само во ширата, и нејзина заштита од развој на оксидациски ензими и од природната флора, а дава одлични услови за ферментација со култивирани квасци.

Други предности се дека овој мацерациски процес трае само неколку часови, ферментацијата е побрза и боите се обично добри. Како било, недостатоците често се поважни од предностите. Велиме недостатоци бидејќи греењето опфаќа дополнителни трошоци, танинската структура во виното може да биде надвор од рамнотежа, има ризик од „сварени“ мириси во виното, и процесот на бистрење е технички отежнат. Поради овие причини, овој тип на мацерација често е подобрен со негово комбинирање со делумна мацерација што е спроведена според стандарден начин.

**Претферментациски ладна мацерација** е релативно нова техника која насочува на зголемувањето на изразување и интензитет на различни ароми од грозјето без да се доведат во прашање финесите. Таа може да биде подобро наречена „течна мацерација“ (без алкохол) и трае толку долго колку што е неопходно да дозволи раното растворање на одредените одбрани супстанции од грозјето во ширата. Затоа, за спречување на ферментацијата, овој процес се случува со држење на смесата под 10 ⁰С.

Мацерациска претферментација на Фредо (МPF-Macerazione Prefermentativa a Freddo) или ладна претферментациска мацерација, дозволува зголемено растворање молекули кои создаваат растителни ароми и поради тоа е многу корисна во винификација на вина. Покрај сево тоа, точно е дека, како општо правило, вината направени со МРF-метод развиле појаки овошни карактеристики кои се многу пожелни за млади црвени вина кои денес опфаќаат значаен дел од меѓународниот пазар.

**Долга мацерација комбинирана со ферментација** доаѓа по претферментациската мацерација со употреба на култивирани квасци. Оваа фаза завршува со екстракција на антоциани и започнува утврдување на количеството на боја низ реакциите од антоциани со танини. Ова исто така донесува поголема ароматска комплексност со помош на алкохолот и процесите од квасците во ферментацијата.

Независно кој тип мацерација ќе биде избран или нема да има мацерација, **ферментацијата** (со селектиран квасец) продолжува и е бурна од 4 до 10 дена, а потоа се смирува и настапува тивко вриење кое трае 6-8 недели на контролирана температура, зависно од грозјето и виното што треба да се добие.

Алкохолната ферментација ќе започне порано доколку температурата е повисока, исто така и ферментацијата ќе биде поинтензивна и ќе трае пократко време. Меѓутоа, квасецот е многу осетлив на високи температури, и може да дојде до чести прекини на ферментацијата, па затоа температурата треба да биде пониска од 30 ⁰С.

**3.1.4. Формирање на правиот (вистинскиот) квалитет на**

 **виното**

После вриењето виното се дозрева со одлежување неколку месеци, при што во него се одвиваат физички, хемиски и биохемиски промени и се формираат органолептичките својства.

За време на одлежувањето младото вино неколку пати се преточува заради пречистување. Старите вина исто така се преточуваат 1 до 2 пати годишно.

Во денешно време развојот на хемиската индустрија овозможува подигнување на нивото на квалитет на вината со различни видови додатоци со кои може да се влијае како врз бојата, така и врз органолептичките особини на вината.

За формирање на правиот квалитет на вината многу е важно да се води сметка за квалитетот на подрумот каде што виното одлежува и тоа во поглед на температурата и осцилациите на температурата, влажноста, присуството на светлина и др..

Уште пред повеќе од 100 години било забележано дека во некои вина покрај алкохолното вриење или потоа, во текот на чувањето доаѓа до налување на киселоста. Денес е познато дека станува збор за разградба на јаболковата киселина, која некои видови млечнокисели бактерии, присутни во виното, ја разлагаат на крајни продукти: млечна киселина и јаглероден диоксид. Поради ова, овој процес често се нарекува и биолошка разградба на киселините или биолошка деацидификација на виното. Некој оваа појава ја нарекуваат и второ вриење (малолактичко вриење), укажувајќи на нејзиното значење во формирањето на квалитетот на виното.

Во процесот на биолошко намалување на киселоста на вината со млечнокисели бактерии, при поволни услови за нив ја метаболизираат горчливата јаболкова киселина во благи и вкусни млечни киселини и јаглероден диоксид. По разградбата на јаболковата киселина, таквото вино станува попитко и со поскладен вкус. Намалувањето на концентрацијата на вкупни киселини може да изнесува 1-3 g/l, па и повеќе. Малолактичкото вриење може да заврши со тихото вриење на младото вино или до првото преточување и да заврши речиси неприметено. Но оние кои произведуваат вино и водат сметка за неговиот квалитет, секако треба да водат сметка не само да го следат процесот на малолактичко вриење, туку и да го усмеруваат зависно од типот на виното.

Во услови на современа винарска технологија се препорачува примена на препарати од чисти култури на млечнокисели бактерии, што му овозможуваат на енологот контрола и усмерување на процесот на разградба на јаболковата киселина во виното. Чистите култури на бактерии од врстата *Leuconostoc oenos* се применуваат во виното за време на тивкото вриење и го овозможуваат избегнувањето на несаканите промени во составот и својствата на виното, кои може да се појават во спонтаната разградба на јаболковата киселина.

По завршената ферментација и првото преточување виното треба уште да стои, додека се исталожат најмногу од квасните клетки и фино суспендиран материјал. Виното потоа се филтрира без нарушување на талогот или квасецот. Времето што е потребно виното само од себе да се избистри и достигне стабилна кристална бистрина, може да трае и до 2 години. Вината кои не се наменети за пазар туку за лична потрошувачка, не мора да се бистрат со додавање одредени средства. Меѓутоа, вината кои се произведени за продажба, и пред сè, оние што се наточени во шишиња, или вина кои сакаме да ги чуваме повеќе години, потребно е да поседуваат стабилна и кристална бистрина која се постигнува со бистрење.

Под бистрење се подразбира додавање разни средства во виното со кои се врши отстранување на честичките на матност од вината. Овие честици го маскираат вкусот и мирисот на виното, па затоа избистреното вино добива чист вкус и мирис, а со тоа станува и подобро за созревање и оставање за подолго чување во шишиња. Средствата за бистрење мора да бидат потполно чисти, да не го менуваат хемискиот состав на виното, ниту да го менуваат вкусот и мирисот.

Средствата кои се користат за бистрење на вината може да се поделат на органски и минерални, или растворливи и нерастворливи. Органски средства се: желатин, танин, белка од јајце, безмасно млеко, ензимски препарати, и др., а во минерални спаѓаат бентонит, каолин и др..

По завршената ферментација на виното и неколку пати преточување за да се ослободи од вишокот на талог, младото вино е грубо, сурово и му е потребен одреден период да се смири. Ова смирување или стареење на виното може да се направи во неутрални цистерни од инокс-материјал, бетонски цистерни и сл.. Или може да се направи во мали, релативно нови дрвени буриња кои не се неутрални, но позитивно влијаат врз еволуцијата на младото вино.

Со стареењето на виното во дабовите буриња во него се вградуваат суптилни ароми. Различни типови даб (во најширока употреба се француски и американски даб) од различни региони даваат различен вкус на вината (најчесто вкус на ванила). Виното со одлежувањето во бурињата минува низ различни хемиски промени кои при крајот на ферментацијата резултираат со поголема комплексност, омекнување на грубите танини и арома. Бурињата во принцип овозможуваат бавна оксигенација на виното и вградување на карактерот од поедино дрво во виното. Ова влијание се намалува со честа употреба на исти буриња. Обично 50% екстракт кој се излачува од бурето во виното е во првата употреба, 25% во втората, и натаму се помалку и помалку.

Полнењето на вино во шишиња подразбира неколку работи во финализација на виното за потрошувачка:

* Одбирање и проверка на квалитетот на виното кое сакаме да го полниме во шише.
* Одбирање на соодветен тип шише, проверка на квалитетот, подготовка на шишињата за полнење и полнење на шишињата со вино.
* Одбирање и подготовка на соодветниот вид и квалитет на затворачи.
* Одбирање и проверка на квалитетот и исправноста на декларацијата на етикетите.

Со полнењето на шишиња треба да се постигне:

* Одржување на квалитетот на виното и негово подобрување, по пат на зреење и стареење во шишето (зреење во шише).
* Поекономична постапка во полнењето на шишињата, а истовремено да се постигне саканата цел.
* Да биде обезбедена трајност во микробиолошки поглед, а физичко-хемиската трајност да биде што подолга.

Според бојата вината се делат на бели, розе и црвени.

Според Законот за вино [99] најзначајна е класификацијата на вината според квалитетот на:

1. Трпезни вина;
2. Регионални вина (или трпезни вина со географска ознака - ВГО);
3. Вина со контролирано потекло (ВКП) и
4. Вина со контролирано и гарантирано потекло (ВКГП).
5. **Трпезно вино** е вино кое:
* е произведено од сорти грозје класифицирани како препорачани или одобрени сорти на винско грозје во согласност со членот 28 на овој закон;
* има вистинска јачина на алкохол според волумен поголема од 9,0%vol. и вкупна јачина на алкохол според волумен помала од 15%vol. и
* има вкупна содржина на киселост, изразена како винска киселина, не помала од 3,5 грама на литар или 46,6 милиеквиваленти на литар.
1. **Регионално вино (или вино со географска ознака – ВГО)** е трпезно вино со географска ознака, чија област на потекло е реон и е произведено во согласност со следниве правила:
* да е произведено целосно од сорти на грозје што се класифицирани како препорачани сорти за реонот на потекло во согласност со членот 28 на овој закон,
* да ги има сите карактеристики утврдени согласно овој закон;
* да има минимум природна јачина на алкохол од 9,5%vol. и
* виното да ја поминало физичко-хемиската анализа.
1. **Вино со контролирано потекло (ВКП)** е вино со ознака на потекло чија област на потекло е прецизно обележана во рамките на виногорје или во рамките на помала географска единица од истото и ги исполнува најмалку следниве карактеристики:
* 85% од грозјето да потекнува од областа на потекло (виногорје) чие име го носи;
* да е произведено целосно од сорти на грозје што се класифицирани како препорачани сорти за тоа виногорје или помала географска единица во согласност со член 28 на овој закон;
* да е произведено според правилата за производство на тоа вино со контролирано потекло, пропишани во согласност со членот 42 на овој закон;
* минимум природна јачина на алкохол да е 10%vol. и
* виното да ја поминало физичко-хемиската анализа.
1. **Виното со контролирано и гарантирано потекло (ВКГП)** е вино со ознака на потекло, препознатливо според специфичните карактеристики и високиот квалитет, чијашто област на потекло е прецизно обележана во рамките на еден или неколку локалитети или помали лозарски единици и ги има најмалку следниве карактеристики:
* 100% од грозјето да потекнува од локалитетот или помалите лозарски единици чиешто име го носи;
* произведено е целосно од сорти на грозје што се класифицирани како препорачани сорти за таа лозарска единица во согласност со членот 28 на овој закон;
* произведено е според правилата за производство на тоа вино со контролирано и гарантирано потекло, пропишани во согласност со членот 42 на овој закон;
* винификацијата се извршува во рамките на самата област на потекло или во непосредна близина на локалитетот или помалите лозарски единици од каде што

потекнува грозјето, но не надвор од виногорјето на коешто припаѓа и

* виното ја поминало физичко-хемиската анализа.

Според Законот за вино [99] класификацијата на вината со географски назив се:

1. **Регионалните вина (или трпезни вина со географска ознака – ВГО),**
2. **Вината со контролирано потекло (ВКП) и**
3. **Вината со контролирано и гарантирано потекло (ВКГП).**

Заради заштита на географското потекло на виното, областите погодни за производство на вино со географски назив се делат на:

* реони,
* виногорја и
* локалитети, месности и ограничени лозарски единици.

Ознаката на категоријата на квалитетот на виното во прометот има повеќенасочно значење, затоа што во прв ред му го олеснува патот на потрошувачите до посакуваниот квалитет, на производителот да ја постигне посакуваната цена за остварениот квалитет, а значајна е и од аспект на вршење контрола на квалитетот на виното во прометот од страна на инспекциските органи.

**Глава 4. Оценување квалитет на вино**

Квалитетот на сите типови вина се утврдува **органолептички** (дегустациско-сензорно) и со **хемиска анализа**. Како и кај сите други пијалаци органолептичките особини се од примарно значење за квалитетот.

Хемиска анализа се прави во текот на производството како и кај готовиот производ (вина) за пазар поради контрола на исправноста. Покрај овие две анализи кај вината се испитува уште и **микробиолошка исправност.**

**4.1. Органолептичко оценување (стручно дегустациско-**

 **сензорно) на виното**

Сензорното оценување на квалитетот на вината е одговорна и тешка работа. При описното оценување на квалитетот на вината потребно е што пообјективно да се изразат сензорните впечатоци, при што обученоста и извежбаноста на оценувачите во голема мерка влијае врз степенот на објективност при оценувањето.

Со цел јасно да се дефинираат сите потребни сензорни карактеристики кај вината, неопходно е во теоријата и практиката да се установи и втемели еден вокабулар (речник) од тесностручни термини и поими. Оваа специфична терминологија би имала за цел јазички јасно да истакне сè што е во непосредна врска со квалитетот на вината.

Во оваа смисла треба да се истакне дека постоењето и на најсовршен речник тешко може да ги опфати сите карактеристики и разновидности кои се присутни при опишувањето на сензорните карактеристики на вината каде што се подразбира постоењето на **вкус, мирис, буке, хармоничност, сортна типичност (племенитост), боја и бистрина.**

 Виното што се пушта во промет мора во поглед на органолептичките својства да ги исполнува следниве услови:

* да има боја својствена на соодветното вино;
* да е бистро;
* да има својствена миризба на соодветното вино;
* да има својствен вкус на соодветното вино.

**Вкусот** е најважниот параметар на квалитетот на виното. Тој претставува комлетен впечаток кој во најголем дел потекнува од количествата и ускладеноста на алкохоли, шеќери, киселини, танини и специфични состојки, јаглероден диоксид, естри, алдехиди, кетони и др.. Танинот е трпкава супстанција која се содржи во лушпата и семките. Тој е природен кинзерванс и овозможува на виното да стои 10, 20 и повеќе години. Поради својата комлексност треба да му се пријде со крајна сериозност и да се одредат најадекватни термини со кои ќе се опишат стекнатите впечатоци. Според импресиите кои оценувачот може да ги стекне во текот на држењто на овие пијалоци во устата, за време на голтањето, како и потоа со респираторното издишување после голтањето т.н. резидуален дел на вкусот, виното може да биде: полн, празен, тап, кисел, хармоничен или нехармоничен, умерено резлив, резлив и многу резлив вкус. Кај квалитетните вина посебно се цени оригинален, специфичен и изузетен вкус.

**Мирисот** е вториот важен параметар на квалитетот на виното. Се оценува слично како вкусот: дали е нормален (без туѓа миризба), сортна типичност и интензитет. Виното може да има: нормална миризба на вино, мускатна миризба кај виното од мускатните сорти и специфичен мирис на одделни сорти. Виното во промет не смее да има туѓа миризба.

**Буке** е племенит мирис кој се развива во виното од висококвалитетни сорти со одлежување најмалку три години во стаклени шишиња.

**Бојата** претставува значаен параметар на квалитетот на виното. Бојата на виното зависи од технолошката обработка и сортата на грозје.

Кај **белите вина** бојата може да биде: бледожолта, жолта, зеленикаво жолта, маслинеста, килибарна и златножолта.

Кај **розовите вина** бојата може да биде: бледорозова, светлорозова, светлоцрвена, светлорубинова и рубин.

Кај **црните (црвените) вина** бојата може да биде: темнорубинова, црвена и темноцрвена.

**Бистрината** е еден од параметрите на сензорниот квалитет на вината. Бистрината е едно од барањата кој треба да ги исполни секое вино. Може да се каже дека таа е во синергистичка врска со чистината и нијансата на боја и придонесува за севкупната визуелна допадливост на вината. Според степенот на бистрина виното може да биде: кристално бистро, бистро, магличаво матно и матно со повеќе или помалку талог на дното на шишето кој може да биде кристален правлив или во форма на снегулки и лесно или тешко да се придвижува. Виното во промет мора да биде кристално бистро или бистро, со помалку изразена опалесценција.

**Органолептичките својства на виното** ги оценува со сензорски методи комисијата за дегустација на вина, составена од најмалку пет членови. За оценување на органолептичките својства на вината се користи **метод на позитивни бодови** (систем од 0 до 20). Оценувањето на вината се врши со бодирање на основата на одделни особини. Збирот на сите поени ја дава бројно изразената органолептичката вредност на виното. Просекот на оценката на сите членови на комисијата е конечна оценка.

Одделни органолептички својства на виното се вреднуваат на следниов начин:

* **Боја:** од 0 до 2 бода
* **Бистрина:** од 0 до 2 бода
* **Миризба:** од 0 до 4 бода
* **Вкус:** од 0 до 12 бода
* **Хармоничност и сортна типичност** не се оценуваат посебно, но се земаат предвид при оценката на вкусот и мирисот.

**Вкупно: 20 бода**

**4.2. Основни хемиски анализи на вино**

**4.2.1. Одредување содржина на алкохол во вино**

Под природен (вистински) алкохол во виното се подразбира вистинското количество алкохол кое настанало со ферментација на шеќерот од грозјето, изразено во ***vol.%,*** а под вкупен алкохол во виното се подразбира природниот алкохол, како и потенцијалниот алкохол кој може да настане од непревриениот шеќер во виното, изразен во ***vol.%.***

Содржината на алкохол се одредува со ебулископ, кој претходно е баждарен.

Одредувањето на волуменската концентрација на алкохол во вино со ебулископ се вбројува во брз, едноставен и прецизен метод кој се заснова на разликата во точката на вриење на водата и алкохолот. На нормален атмосферски притисок водата врие на 100⁰С, а етил алкохолот на 78.3⁰С. Точката на вриење на виното се наоѓа помеѓу овие две температури. Виното со повисок % на алкохол врие на пониска температура.

**4.2.2. Одредување количество вкупни киселини во вино**

 За анализа на вкупни киселини во вино се применува принципот на вкупна титрациска киселост. Овој принцип се заснова на титрација на алкохолните пијалаци со раствор од 0.1 mol/l натриум хидроксид со индикатор бром-тимол сино (може да се употреби и фенолфталеин).

 Во чист и сув ерленмаер се става 10 ml вино, 2 ml индикатор бром-тимол сино и се титрира со 0.1 mol/l раствор на натриум хидроксид до зелена нијанса. Потрошениот волумен на натриум хидроксид (ml) се множи со факторот 0.75 и се добива вредноста за количеството на вкупните киселини во виното (g/l).

**Подготовка на основен раствор на бром-тимол сино**

Грам бром-тимол сино се раствора во помало количество дестилирана вода и се налева во колба од 100 ml, се додава 20 ml 96% етил алкохол, 7.4 ml 0.1n р-р натриум хидроксид и се дополнува со дестилирана вода до марката. Се чува во стаклен сад од темно обоено стакло со шлифован затворач. Ако е добро приготвен растворот треба да има зелена боја. Тоа е основен раствор и од него се приготвува растворот со работна концентрација.

**Подготовка на индикатор бром-тимол сино**

10 ml од основниот раствор на бром-тимол сино се налеваат во колба од 100 ml. Пипетата се проплакнува со дестилирана вода и се дополнува колбата со дестилирана вода до марката, растворот се промешува заради хомогенизација.

**4.2.3. Одредување количество екстракт во вино**

 За анализа на количеството на екстракт во вино се применува стандарден гравиметриски метод. Овој метод се заснова врз постапка на директно испарување на алкохолните пијалаци на водена бања и дополнително сушење во сушална на 105⁰С до константна тежина.

На аналитичка вага се мери масата на празна порцеланска здела, во зделата се ставаат 25 ml вино и таа се поставува на водена бања бавно да испарува, сè до моментот на појава на густ сируп. Потоа зделата се става во сушара на 105⁰С и се вади од неа откако ќе се добие сув остаток, за да се стави во ексикатор каде што стои сè додека потполно не се излади. На аналитичка вага се мери масата на порцеланска здела со изладената смеса, и разликата помеѓу масата на полна и празна здела се множи со фактор 40, а резултатот се изразува во (g/l) екстракт.

**4.2.4. Одредување специфична тежина на вино**

 За анализа на специфична тежина на вино се применува стандарден пикнометарски метод. На аналитичка вага се мери масата на сув пикнометар. Пикнометарот се полни со дестилирана вода (20⁰С) до ознаката и се пренесува во водена бања од 20⁰С каде што стои околу час, па се мери масата на пикнометар со вода. Разликата во масата помеѓу полниот пикнометар со вода и празниот пикнометар е масата на вода. Се празни пикнометарот, се плакне со алкохол, се суши и потоа се полни со вино до ознаката и се пренесува во водена бања од 20⁰С каде што стои околу час, а потоа се мери масата на пикнометарот со вино. Разликата во масата помеѓу полниот пикнометар со вино и празниот пикнометар е масата на вино. Специфичната тежина на виното се добива со делење на масата на вино со масата на вода.

**4.2.5. Одредување pH на вино**

 ***pH*** на виното го одредува според стандарден инструментален метод со помош на ***pH*–метар.** *pH*–метарот се состои од специјална сонда за мерење (стаклена електрода), поврзана на електронски мерач кој ја мери и ја покажува измерената *pH*–вредност. Сондата на *pH*–метаротја мери *pH*–вредноста како активност на водородните јони кои го опкружуваат нејзиниот тркалезен крај. Сондата произведува мала волтажа (околу 0.06 V на единица *pH* ) што се мери и покажува како *pH*–вредност со помош на *pH*–метарот.Мерачот во основа е само обичен волтметар кој покажува *pH*–единици наместо волти.

*pH*–метароте електронски инструмент кој се користи за мерење *pH* (киселост или алкалност) на течни примероци (органски/неоргански; природни/синтетски). Мерното подрачје на *pH*–метарот е: 0.000 - 14.000 *pH;* 0.0 – 99.9 ºC; - 1999.9 до + 1999.9 mV.

**4.3. Одредување интензитет на боја, нијанса, состав на**

 **бојата и сјајност на вино**

Директни мерења на црвените вина на апсорбанс од 420 nm (жолта компонента од бојата на виното), 520 nm (црвена компонента од бојата на виното), и 620 nm (сина компонента од бојата на виното) [100]со користење на спектрофотометарот. **Интензитетот на бојата на вината (CI)** се пресметува како збир од **А420 nm + А520 nm  + A620nm**, а **нијансата (H)** како однос од **А420/А520**. Составот на бојата на вино, е искажана како процент, кој се пресметува според следнава равенка:

**%Ye** или **%Rd** или **%Bl= 100 (Aλ / CI)**

каде што: **%Ye** е процент на жолта боја (λ=420 nm**), %Rd** е процент на црвена боја (λ=520 nm) и **%Bl** е процент на сина боја (λ=520 nm) од вкупната боја.

 **Сјајноста на вино (dA)** се пресметува според следнава равенка:

 **dA (%) = (1- (A420 + A620/2A520)) x 100**  [101].

**4.4. Полифенолни соединенија во виното**

**4.4.1. Анализа на вкупни феноли**

Методот според Folin-Ciocalteu, соопштен од Slinkar and Singleton (1977)[102, 103] се употребува за одредување на вкупните феноли во виното. Накратко, точно ml од погодно разреден вински примерок се додава во 10 ml мерна колба, која содржи 5 ml дестилирана вода. Потоа, 0.5 ml од реагенсот Folin-Ciocalteu се додава и содржината се меша. По 3 min, се додава 1.5 ml 20 % раствор Na2CO3, и се додава дестилирана вода до вкупен волумен од 10 ml. Откако примероците ќе отстојат на 50°C (водена бања), 16 min во затворени колби и потоа ладење, нивните апсорбанси се читаат на 765 nm наспроти дестилираната вода како слепа проба и се искажуваат како еквивалент на гална киселина (GAE, mg/l), засновано на калибрациска крива што е добиена со стандардни раствори на гална киселина (0-100 mg/l).

**4.4.2. Анализа на вкупни антоциани**

За одредување на вкупните антоциани во црвено вино се употребува предложениот метод од Di Stefano and Cravero (1989)[104]*.*Примероците вино се разредуваат со составениот рааствор од 70/30/1 (v/v/v) етанол/вода/HCl (концентрирана), а апсорбансот се мери на 540 nm. Концентрацијата на антоциани се пресметува со користење на равенката што е предложена од Di Stefano and Cravero (1989)[104].

**TA540 nm (mg/l) = A540nm · 16.7 · d**

каде што **A540nm** – апсорбaнс на 540 nm, **d –** разредување искажано како еквиваленти на малвидин-3-глукозид.

**4.4.3. Анализa на вкупни флавоноиди**

За одредување на вкупните флавоноиди во вино се употребува колориметриска анализа со алуминиум хлорид и **(+)**-катеин како стандард за калибрација според Zhishen *et al.* (1999)[105].Накратко, точно ml од погодно разреден вински примерок се додава во 10 ml мерна колба, која содржи 4 ml дестилирана вода, проследено со додавање на 0.3 ml

 5 % NaNO2 и 5 min, подоцна 0.3 ml 10 % AlCl3. По 6 min се додава 2 ml 1 M NaOH со мешање, и се додава дестилирана вода до вкупен волумен од 10 ml, растворот се меша, а апсорбансот се мери на 510 nm наспроти припремената слепа проба со вода. Катеинот е употребен како стандард за цртање на калибрациска крива, а концентрациите се искажуваат како еквиваленти на катеин (mg/g CE).

**4.4.4. Анализа на вкупни катеини**

За одредување на вкупните катеини (процианидински мономери) во вино, се употребува методот на Di Stefano *et al.* (1989)[106] со употреба на реагенсот (*p*-DMACA) p-(dimethylamino) cinnamaldehyde и катеин како стандард за цртање на калибрациската крива. Накратко, точно ml од погодно разреден вински примерок се додава во 10 ml мерна колба, проследено со додавање 3 капки глицерол и 5 ml 1 % p-DMACA-реагенс, и се додава метанол до вкупен волумен од 10 ml. По 7 min апсорбансот се чита на 640 nm, наспроти слепа проба со метанол. Реагенсот *p*-DMACA се подготвува веднаш пред употребата, и се одржува 1 % (w/v) *p*-DMACA во ладна смеса од метанол и HCl (4 : 1).

Ова се само дел од методите за анализа на вино кои не се ни најнови ни единствени. Постојат и други методи, понови кои често се се користат.

**4.5. Микробиолошка исправност на вина**

Според Закон за безбедност на храната и на производите и материјалите што доаѓаат во контакт со храната [107] и Правилникот за микробиолошка исправност на намирниците во промет [108]мораат да бидат микробиолошки исправни, односно мораат да одговараат на условите пропишани во овој правилник.

Ако во овој правилник за поедини намирници не е поинаку кажано, намирниците во промет не смеат да содржат:

* бактерии од видовите *Salmonella* во 25 g (ml);
* коагулаза на позитивни *Staphylococus*во 0.01 g (ml);
* сулфиторедуктивни клостридии во 0.01 g (ml);
* видови *Proteus*во 0.001 g (ml);
* *Escherichia coli* во 0.001 g (ml).

**4.5.1. Микробиолошки анализи на вино**

За следење на микробиолошката исправност на вина, се испитуваат следниве значајни групи и видови микроорганизми:

* вкупен број бактерии во виното во ml;
* вкупен број квасци во виното во ml;
* вкупен број габи (мувли) во виното во 1 ml
* вкупен број сулфиторедуктивни клостридии во виното во 0.1 ml;
* Бактерии од видовите *Salmonella* и *Shigella* во виното во 25 ml;
* Бактерија *Staphylococus aureus* во винотово 0.1 ml;
* Бактерија *Proteus spp*. во виното во 0.1 ml;
* Бактерија *Escherichia coli* во виното во 10 ml.
1. Бактерии од видовите *Salmonella* и *Shigella* видови во виното во 25 ml

Се зема 25 ml вино во ерленмаерка и во него се додава 225 ml селенит бујон, и тоа се остава 24 часа во термостат на 37°С. По 24 часа со еза се пресадува на SS- подлога (за бактерии *Salmonella* и *Shigella*) и пак се остава во термостат 24-48 часа на 37°С.

* Селенит бујон

|  |  |
| --- | --- |
| - пептон | 0,5% |
| - лактоза | 0,4% |
| - натриум селенит (Na2Se2O) | 0,4% |
| - натриум фосфат (Na3PO4) | 1,0% |

1. Се прави соодветно разредување на вината за понатамошните анализи и тоа: ml вино се пренесува во епрувета со 9 ml физиолошки раствор и така се добива основно разредување.

ml вино + 9 ml физиолошки раствор = 10 ml раствор на вино

1. Бактерија *Staphylococus aureus*во винотово 0.1 ml

 ml од погорниот раствор на вино се става на цврсти BP-подлоги (BAIRD-PARKER) за бактерија *Staphylococus aureus****,*** исе остава во термостат 24 часа на 37°С. Колониите од *Staphylococus aureus* се ситни црни како јаглен, опкружени со светла зона на лизиран лецитин.

* ETGP-агар според Baird-Parker

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| -триптон  | 1,0% |
| - екстракт од месо | 0,5% |
| - литиум хлорид (LiCl) | 0,5% |
| - екстракт од квасец | 0,1% |
| - агар | 2,0% |

**4.** Бактерија *Proteus spp*. во виното во 0.1 ml

ml од погорниот раствор на вино се става на SS- подлога за бактерија *Proteus spp.,* и се остава во термостат 24-48 часа на 37°С.

* SS agar

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| - пептон | 5,0 g |
| - екстракт од месо | 5,0 g |
| -лактоза | 10,0 g |
| - жолчни соли | 8,5 g |
| - натриум цитрат (C6H5Na8O7 ·2H2O) | 8,5 g |
| - натриум тиосулфат (Na2S2О3 ·5H2O) | 3,5 g |
| - ферицитрат (FeC6H5O7· 5H2O) | 1,0 g |
| - агар | 13,0 g |
| - неутрално црвенило | 0,023 g |
| - брилијант-зелено | 0,00033 g |

1. Вкупен број сулфиторедуктивни клостридииво виното во 0.1 ml

 ml од погорниот раствор на вино се става на подлога од сулфитен агар за сулфитордуктивни клостридии, и се остава во термостат 24-48 часа на 37°С.

* Сулфитен агар

|  |  |
| --- | --- |
|  Состав: |  |
| -триптон  | 15,0 g |
| - екстракт од квасец | 10,0 g |
| - дестилирана вода | 750 ml |
| - вода за пиење (aqua fontis) | 250 ml |

Непосредно пред употреба, на 100 ml растопена и на околу 45°C изладена

 подлога се додаваат растворите:
 - ml 5% воден раствор на железо цитрат (FeC6H5O7· 5H2O),
 - ml 5% воден раствор на натриум сулфат (Na2SO4· 2H2O),
 - ml 1% воден раствор на калиум перманганат (KMnO4)

Сулфиторедуктивните клостридии, на оваа подлога, растат во облик на топчести

црни колонии.

1. Бактерија *Escherichia coli* во виното во 10 ml

На течна подлога MAC Conce (5 ml) се додава 10 ml вино за бактеријата *Esherichia coli* и се остава во термостат 24-48 часа на 44°С. Создавањето на гасови во Дурхамовите цевчиња, по 24 или 48 часа означува сомнеж дека во подлогата дошло до растење на *Esherichia coli.* Со еза се пресејува на површина на виолетовоцрвен жолчен агар кој се инкубира 34 до 48 часа на 44°С. Растење на карактеристични колонии  *E. сoli* на површината на подлогата и наоѓањето на грам- негативни стапчиња во микроскопскиот препарат се означува како позитивен случај.

1. Вкупен број квасци и мувливо виното во ml

Се става ml вино на Саборалд -подлога за квасците и мувлите, и се остава во термостат 3-5 дена, на собна температура.

После инкубирањата се бројат пораснатите колонии, како при одредување на бројот на микроорганизми во ml и се искажуваат како број на квасци и мувли во милилитар.

* Саборалд-малтозен агар

|  |  |
| --- | --- |
| Состав: |  |
| - пептон | 1,0% |
| - малтоза | 4,0% |
| - агар | 2,0% |

1. Вкупен број бактерии во виното во ml

 Се става ml вино во плоча со агар за број на бактерии, и се остава во термостат 24-48 часа на 37°С.

После инкубирањето, се бројат колониите на плочите на кои пораснале. Добиениот број колонии се искажува со вистински утврдениот број микроорганизми на ml.

**Глава 5. Примена на ензими во правење на виното**

**5.1. Примена на пектинолитички ензими во правење на**

 **виното**

Многу од биохемиските реакции вклучени во производството на вино се ензимски катализирани. Тие почнуваат за време зреењето и берењето на грозјето, и продолжуваат низ алкохолната и малолактичката ферментација, бистрење, и одлежување. Винарите често ги дополнуваат природните ензими со комерцијални ензими за зголемување на производниот капацитет на бистри и стабилни вина со зголемено тело, мирис и буке.

 Кога ќе се додаде ензим во грозјето или ширата, доаѓа до зголемување на количеството на самоток и екстракција на боја, и мирисни соединенија, а исто така го намалува времето за пресување и ферментација. Овие пектинаси или пектинази што содржат хемицелулази може да го зголемат количеството на самоток од 20 до 30 % и го намалат времето за ферментација од 30 до 50 % со намалување на вискозитетот.

 Брзото бистрење и доброто одделување на талозите има позитивен ефект на крајната винска арома, структура и боја. Пектиназите ја депектинизираат гроздовата шира за време на ферментацијата или младите вина пред пречистување и филтрација. Гроздовите шири и вина што се третирани со пектинази се помалку вискозни, а ферментираат, се таложат и созреваат побрзо. Пектинази со ß-гуканази се користат за деградирање на *Botrytis*-глуканот. Вината направени од презрело грозје заразено со мувла *Botrytis cinerea* тешко се бистрат и филтрираат поради високата концентрација на добиениот глукан од *Botrytis.* Употребата на вакви ензими може да го забрза бистрењето и филтрацијата.

 Кисели протеази ги бистрат и стабилизираат некои вина со намалување или отстранување на природно добиените и синтетизираните од квасецот, топлонестабилните протеини.

 Во правењето вино, природно присутниот пектин од клеточните sидови може да предизвика заматување од индивидуално поврзување на пектинските молекули едни со други и со други цврсти суспендирани честички во виното. Ова заматување може да биде вознемирувачко затоа што средствата за разбистрување често се неспособни да го отстранат ова.

 Пектинoлитички ензим или пектиназа е ензим кој ги цепи врските на големите пектински молекули а пак тие го бистрат матежот и ослободуваат повеќе овошни карактеристики. Како пектинот, така и пектиназата е природно присутна во овошјата и го цепи пектинот како што созрева овошјето, го омекнуваат овошјето и ослободуваат мирис и сок. Комерцијалните пектинолитички ензими се на располагање во прашкеста и течна форма од различни производители, секој со индивидуални препораки за употреба. Пектиназите или пектинолитичките ензими земаат 25% од светската трговија на прехранбени ензими. Познати светски производители на комерцијални пектинолитички ензимски препарати се: AB Enzymes GmbH, Германија; Novozymes France S.A., Франција; Erbslöh Geisenheim AG, Германија; Vintessential, Австралија; Lallemand, САД ; Enzyme Development Corporation, САД ; DSM Valley Research, САД ; Кокот Агро д.о.о., Хрватска и др..

 Ензимските препарати се произведуваат за различни намени како за мацерација, бистрење, ослободување на арома и др.. Исто така се произведуваат ензимски препарати за правење црвено вино и ензимски препарати за бело вино. Ова е битно да се знае за да може купувачот да се одлучи каков ензимски препарат ќе купи.

 За сите пектинолитички ензими, виното треба да биде најмалку на 27 ºС за ензимот да работи. Ако се избере да се работи со пектинолитички ензим во прав, треба ензимот претходно да се раствори во ладна дестилирана вода (1 : 10) пред да се додаде во виното. Течните ензими може да се додадат директно во виното према упатствата од производителот, или со претходно разредување со ладна дестилирана вода. Пектинолитичките ензими може да се додаваат на различно време пред и по ферментацијата за цепење на пектинот.

 Ако се сака да се додаде пектинолитичкиот ензим за зголемување на приносот на сок и овошниот карактер, се додава за време на дробењето или пресувањето.

 За заштита од пектинското заматување, пред тоа да се случи, особено за овошните вина, се додава пектинолитички ензим на почетокот од ферментацијата. Со додавањето на ензим од почетокот, ензимот ќе има повеќе време за цепење на пектинот за време на ферментација на сокот, оставајќи што помалку пектин за кој подоцна би можел да предизвика заматување, а и ќе заштеди време за бистрење на виното после завршување на ферментацијата.

 Со цепењето на пектинот, пектиназите обезбедуваат бројни очигледни технички предности, како што се забрзување на претферментациските состојби, бистрење и пресување така добро како и зголемениот рандман на сокот, и според тоа целосно подобрување на квалитетот на ширата.

**5.2. Производство на ензими за правење на виното**

За производството на ензими што се користат во правење вино, селектирани видови се култивираат во ферментори под аеробни услови: *Aspergillus niger* за производство на пектинази и ß-гликозидази, *Trichoderma harzianum*  во случај на ß-гуканази и *Lactobacillus fermentum* во случај на уреаза.

 Добро одреден состав на хранлива средина индуцира оптимално производство на саканите ензимски активности. На пример, хранлива средина богата со пектин ги индуцира микроорганизмите да лачат пектинази во средината. По ферментацијата, пектиназите и ензимските странични активности се изолираат со центрифугирање, ултра филтрација и концентрација. За време на овие состојби микроорганизмите комплетно се отстрануваат од крајниот производ.

**5.3. Состав на ензимите за правење на виното**

**5.3.1. Пектинази**

Главните активности на ензимските формулирања за правење на вино се добиени од фамилијата пектиназа. Тие вклучуваат пектин-лиаза (PL), пектин-метил-естераза (PME), и полигалактуронази (PG). PL-тип на активност, познат како деполимеризација, го цепи пектинскиот синџир меѓу две метилирани галактуронски киселини, додека PG бара не-метилирани супстрати. PME не го деполимеризира пектинскиот синџир но ослободува молекула метанол од галактуронски-естерифицираните киселини. Ова ја смалува активноста на PG.

 Пектиназите, со цепењето на пектинот, прават овозможување на бројни очигледни технички предности, како забрзување на претферментациските состојби, зголемување на приносот на самоток, олеснување на бистрењето и пресувањето што води према целосно подобрување на квалитетот на ширата од грозје, со зголемување на аромата и полифенолните концентрациии.

**5.3 2. Единици на пектиназна активност**

 Денес, секој произведувач на ензим ја употребува неговата сопствена пектиназна активност, со негов метод на мерење и единица. Овие мерења не обезбедуваат укажување на ензимската ефикасност во правењето на вино. Ефикасноста на ензимските препарати во правењето вино е јако поврзано со присуството на страничните активности. Главната пектиназна активност сама не ги обезбедува сите погодности. Поради ова, ензимската ефикасност во правењето вино треба да биде проверена низ применети проби. Ова не е можно да ги спореди производите од различни потекла, засновани на активноста обезбедена од снабдувачот на етикетата на производот или спецификацискиот лист.

**5.3.3. Гликозидази**

Такви ензими се од важност за видови грозје што содржат арома, претходници поврзани со шеќерните половини. Врзаната арома со шеќерите не е испарлива. Кога шеќерот е отстранет аромата станува испарлива и според тоа ароматична. Во *Vitis vinifera* се главно ди-гликозиди, кој сакаат монотерпените да се врзат со гликоза и друг јаглехидратен остаток како арабиноза, рамноза или апиоза. Грозјето содржи гликозидази способни на ослободување на ароматичните терпеноли од нивните неароматични претходници. Сепак под условите за правење вино овие ензими не се многу ефикасни. Габичните гликозидаси се ефикасни на *pH* на виното.

**5.3.4. Глуканази**

ß-Глуканази се произведуваат од *Trichoderma harzianium*. Традиционално ß-глуканазите биле користени за подобрување на филтрацијата на вината добиени од заразено грозје со *Botrytis cinerea.* Глуканите се лачеле од *Botrytis* во сокот за време на инфекцијата, па може да предизвика затнување на филтерот. Потцртувајќи дека ß-глуканите се главна компонента на клеточните sидовите на квасците, се појавува алтернативна употреба на овие ензими во зголемувањето на квасните автолизи. Природно, квасната автолиза е долговременски процес кој бара повеќе од 12 месеци по ферментацијата. Комерцијалните глуканази содржат ензими кои го олеснуваат подобрувањето на квасна автолиза со зголемување на количеството на ослободени соединенија од квасниот клеточен sид во виното.

**5.3.5. Други странични активности**

Природен и комплексен состав на хранлив супстрат се употребува за да се добие ензимска идукција за производство на повеќе ензимски активности. Главната активност во добиениот ензимски производ е проследена со бројни секундарни (странични) активности кои играат улоги на различен степен на важност, некои се неопходни, други неутрални или штетни во специфичните примени во правењето на вино. Со употреба на *Aspergillus niger,* видови специјално селектирани за енолошки цели, ензимските препарати се формулираат за природно зачувани на некои несакани активности во незначително ниво. Некои странични активности може, во некои типови вина, да имаат непожелен ефект, а позитивен ефект во други. Иако овие секундарни активности се толерираат со закон, овие ензими можат во некои случаи да го расипат квалитетот на виното.

**5.3.6. Хемицелулази и целулази**

 Овие странични активности се присутни во различни количества во пектиназните препарати. Тие се барани во мацерацијата на црвеното грозје за да се екстрахира максимум содржината од клетките од лушпа. Тие се несакани во мацерација на бели грозја поради ограничената екстракција.

**5.3.7. Цинамил-естераза**

Во белите вина оваа активност придонесува за хидролиза на естри на хидрокси-циметен-тартарат **(hydroxycinnamyl-tartrate esters),** со ослободување на кумарна **(OH·C6H4·CH:CH·COOH)** и ферулна **(OH·(CH3O)·C6H3·CH:CH·COOH)** киселина, кои по декарбоксилацијата со квасниот сој, води до формирање винил-4-фенол **(vinyl-4-phenol)** и винил-4-гвајакол **(vinyl-4-guaiacol).** Овие соединенија даваат непријатни мириси на водена боја и лак за нокти. Во црвените вина винил-фенолите реагираат со полифенолите и формираат обоени стабилни соединенија. Тоа е важно заради употреба на ензимите за бели вина што содржат незначително ниво на овие странични активности за да се ограничи формирањето на испарливи феноли, а со тоа одржување на нивната концентрација под прагот на толеранција.

**5.3.8. Антоцианаза**

Активноста може да предизвика губење на бојата во црвените вина со ослободувањето на антоцианите од нивниот врзан шеќер. Оваа хидролиза доведува до нестабилна антоцианидин-форма.

**5.4.** **Формулирање на ензимите за правење на виното**

Енолошките ензими може да бидат формулирани во течна или микрогранулирана форма.

**5.4.1. Микрогранулирани ензими**

Овие ензимски препарати нудат добра стабилност за чување, нивното ниво на активност е стабилно кога се чуваат според препорачаните услови на влажност и температура. На собна температура рокот на употреба се движи од 24 до 36 месеци. Гранулираните ензими немаат опасност да бидат загадени после отворањето, па дури и кога би се додавале без заштита.

**5.4.2. Течни ензими**

Овие ензимски препарати треба да бидат складирани на ладна температура. Рокот на траење на овие производи кога се чуваат според препорачаните услови се движи меѓу 12 до 24 месеци. Нивната микробиолошка стабилност е многу тешка за гарантирање и нивната формулација често бара да се употребат средства за чување. На пример, сорбат солите и калиум хлорид се дозволени заштитни средства што се употребени во течните ензимски препарати. Друго средство за стабилизирање што обично се употребува во течните ензими е глицеролот.

**5.5. Ензими за правење бело вино**

**5.5.1. Ензими за таложење**

После дробењето, негативно наелектризираните пектини формираат заштитен слој околу позитивно наелектризираните цврсти честички од грозјето. Ова ги држи цврстите честички од грозјето во суспензија. Ензимите пектинази ги цепат пектинските молекули во помали соединенија, со тоа се изложуваат некои од позитивните наелектризирани цврсти честички од грозјето под овој заштитен слој. Овие позитивни наелектризирања се врзуваат со негативните наелектризирања на пектинот и се формираат поголеми форми од честички. Кога честичките ќе станат преголеми, тие се таложат.

 Ензимите за таложење делуваат главно на растворливите пектини (главно хомогалактуронани) од гроздовата пулпа. Лушпите од грозјето содржат повеќе нерастворлив пектин (протопектин) со повеќе влакнести (комплицирани) региони “hairy regions” (странични синџири). Ензимите за мацерација за разлика од основните ензими за таложење содржат повеќе странични активности кои специфично дејствуваат врз влакнестите делови на пектинот. Како што кај сите видови овошје пектинската структура се менува за време на зрееањето, така и грозјето станува помеко. Многу зрели грозја бараат ензими за таложење со поголема концентрација на PG. Кога се случуваат проблеми со таложењето кај многу зрели грозја, се препорачува да се употребат ензими за мацерација бидејќи тие содржат повеќе PG.

**5.5.2. Ензими за мацерација**

 Претходно спомнавме дека структурата на нерастворливиот пектин во клеточните sидови од лушпата од грозје е покомплексна отколку растворливите пектини од пулпата. Поради оваа причина, ензимите за мацерација се поконцентрирани и содржат неопходни странични активности. Мацерацијата се изведува поради две причини, главно за екстракција на сок и арома. Клеточните sидови на грозјето формираат физичка препрека меѓу сокот во вакуолата на клетките од зрното и надворешната средина. Бидејќи клеточните sидови на грозјето содржат околу 30 % пектин, пектиназите помагаат да ја расцепат оваа физичка препрека и поради тоа да го зголемат приносот на сок.

 Најмногу арома од грозјето и нивни прекурсори (претходници) како што се норисопреноиди, пентанони, тиоли (*Sauvignon blanc*) и терпеноли (*Muscats)* се наоѓаат во гроздовите лушпи. Мацерацијата ја зголемува нивната концентрација во ширата. Приспособените формулирања на ензимите за мацерација на бело грозје содржат намалено ниво на целулази и хемицелулази за да избегнат премногу мацерација.

**5.6. Ензими за правење црвено вино**

**5.6.1. Ензими за мацерација**

Ензимите за мацерација на црвено грозје може да содржат хемицелулази за подобрување на мацерацијата. Приспособенитеформулирања на ензимите за мацерација на црвено грозје содржат многу ниски нивоа на антоцианазна активност, која ги откинува шеќерните единици од покомплексните молекули. Гроздовите антоциани се стабилизирани со ковалентна врска со една гликозна единица. Тие стануваат нестабилни кога овие врски се раскинати.

 Мацерацијата ја зголемува содржината на антоциани, меѓутоа поважна активност на употребените ензими кај црвени грозја е зголемувањето на стабилноста на бојата.

**5.7. Созревање талог**

За да се оствари права квасна автолиза за време од три до осум месеци треба да се употреби комерцијален ензим глуканаза. Автолизата има многу предности за квалитетот на вината, како што е осетот во устата кое е стекнато од полисахариди кои се ослободиле во виното. Одредени манопротеински фракции ја подобруваат стабилноста на протеините, додека други ја подобруваат стабилноста на тартарати. Други соединенија што се ослободени во виното за време на автолизата имаат влијание врз аромата на виното и комплексноста. Многу аминокиселини и нуклеотиди во виното, ослободени со автолиза се извор на храна за организми како што се бактериите *Brettanomyces.* Опасноста од хранење на *Brettanomyces* е поголема кога ензимот е употребен на црвено вино.

**Литература**

1. Čapounova,D., and Drdak,M., 2002: Comparison of some Commercial Pectic Enzyme Preparations Applicable in Wine Technology. *Czech J. Food Sci.,* **20**, 131-134.
2. Rogerson, F.S.S., Vale, E., Grande, H.J., and Silva, M.C.M., 2000: Alternative Processing of Port-Wine Using Pectolytic Enzymes. *Cienc. Technol. Aliment.,* **2**(5), 222-227.
3. Brown,M.R., and Ough,C.S., 1981: A comparison of Activity and Effects of Two Commercial Pectic Enzyme Preparations on White Grape Musts and Wines. *Am. J. Enol. Vitic.,* **32**(4), 2722-276.
4. Castino,M., Ubigli,M., 1979: Use of pectolytic enzymes preparation in manufacture of red wines. *Riv.Vitic.Enol.,* **32**(2), 65-75.
5. Ough,C.S., Noble,A.C., Temple,D., 1975: Pectic enzyme effects on red grapes. *Am.J.Enol.Vitic.,* **26**, 195-200.
6. Ough,C.S., and Crowell,E.A., 1979: Pectic-enzyme treatment of white grapes: Temperature, variety and skincontact time factors. *Am.J.Enol.Vitic.,* **30**(1), 22-27.
7. Villettaz,J.C., Dubourdieu,D., 1991: Enzymes in wine-making. In “*Food Enzymology*”. P.F.Fox(Ed.),Elsevier Science Publishers Ltd.pp 427-451.
8. Carpita,N.C., and Gibeaut,D.M., 1993: Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal.*, **3**, 1-30.
9. Elena Martens-Uzunova., 2008: Assessment of the Pectinolytic Network of Aspergillus niger by Functional Genomics-PhD Thesis, Wageningen University,Wageningen,The Netherlands.
10. Parley,A., 1997: The Effect of Pre-Fermentation Enzyme Maceration on Extraction and Colour Stability in Pinot noir Wine.M.Appl.Sc.,at Lincoln University,New Zealand.
11. Heredia,A., Jimenez,A., and Guillen,R., 1995: Composition of plant cell walls. *European Food research and Technology (Historical Archive).,***200**(1), 24-31.
12. Kadla J.F., and Gilbert R.D., 2000: Cellulose structure: a review *Cellulose* *Chemistry and Technology*., **34**(3-4), 197-216.
13. Watanable,H., & Tokuda,G., 2001: Animal cellulases. *Cellular and Molecular Life Sciences.,* **58**, 1167-1178.
14. Nielsen,P.H., et al., 1991: Enzyme applications(industrial), in *Kirk-Othmer* *Encyclopedia of Chemical Technology* (Fourth ed.)., **9**, 567-620.
15. Wingard,L,B., Katchalsi-Katzin,E., and Goldstein,L.,(eds.)., 1979: *Enzyme Technology.,* New York, Academic Press.
16. National Academy of Sciences Food and Nutrition Board, 1981. *Food* *Chemicals Codex(FCC)* 3-rd Ed. Washington,DC., National Academy Press.
17. White,J,S., and White,D.C., 1997 : *Source Book of Enzymes.,* Boca Raton,CRC Press.
18. Reed,G.,(ed.), 1975: *Enzymes in Food Processing.,* New York,Academic Press.
19. Arnstrup,K., 1979 : Production, isolation, and economics of intracellular enzymes, in Wingard,L.B., Katchalsi-Katzin,E., and Goldstein,L.,(eds.), *Enzyme Technology.,* 28-69, New York. Academic Press.
20. Lilly,M.D., 1979 : Intracellular microbial enzyme production, in Wingard,L.B., Katchalsi-Katzin,E., and Goldstein,L.,(eds.), *Enzyme Technology.,* New York. Academic Press.
21. Kula,M.R., 1979 : Extraction and purification of enzymes using aqueous two-phase systems, in Wingard,L.B., Katchalsi-Katzin,E., and Goldstein,L., (eds.), *Enzyme Technology.,* 71-95, New York, Academic Press.
22. Enzyme Technical Association, 1999. Enzymes used in food processing. Washington, *Enzyme Technical Association* (ETA).
23. Neubeck,C.E., 1975: Fruits, Fruit products and wines. Ch. 14, In *Enzymes in Food Processing*, 2nd ed. G. Reed (Ed.), 397-442. Academic Press, Inc., New York.
24. Whitaker,J.R., 1984: Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. *Enzyme Microb. Technol.,* **6**, 341-349.
25. Plank,P.F.H., and Zent,J.R., 1993: Use of enzymes in wine making and grape processing. Ch. 10, In: *Beer and Wine Production Analysis,Characterisation, and Technological Advances,* B.H. Gump and D.J.Pruett(Eds.),191-196. American Chemical Society, Washington, D.C.
26. Lanzarini,G., and Pifferi,P.G., 1989: Enzymes in the fruit juice industry. Ch. 13, In: *Biotechnology Applications in Beverage Production,* C.Cantarelli and G. Lanzarini (Eds.), 189-222. Elsevier Science Publishers Ltd, London.
27. Felix,R., and Villettaz,J.-C., 1983:Wine. In: Industrial Enzymology: The Application of Enzymes in Industry. T. Godfrey and J. Reichelt (Eds.). The Nature Press, New York. pp410-421.
28. Parley,A., Vanhanen,L., Heatherbell,D., 2001: The effect of pre-fermentation enzyme maceration on extraction and colour stability in Pinot noir wine. *Australian journal of grape and wine research*.,ISSN 1322-7130, **7**(3), 146-152.
29. Brillouet,J.-M., Belleville Moutounet,M.,1991: Possible protein-polysaccharide complexes in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.,* **42**, 150-152.
30. Guerrand,D., 2000 : Prйparations enzymatiques., profiles d’activitй et performances*., Revue Franзaise d’њnologie*.,**183**, 19-24.
31. Wightman,J.D., Price,S.F., Watson,B.T., and Wrolstrad,R.E., 1997: Some effects of processing enzymes on anthocyanins and phenolics in Pinot noir and Cabarnet Sauvignon wines. *Am. J. Enol. Vitic.,* **48**, 39-48.
32. Cruess,W.V., Quacchia,R., and Ericson,K., 1995 : Pectic enzymes in winemaking., *Food Technol.,* **9**(12), 601-607.
33. Wightman,J.D., 1995: Use of Anthocyanin Analysis to Determine Glycosidase Activity in Juice-and Wine-Processing Enzymes. PhD Thesis, Oregan State University.Corvallis.
34. Servili, M., Begliomini, A.L., Montedoro, G., 1992: Utilisation of a yeast pectinase in olive oil extraction and red wine making processes. *J. Sci. Food*. *Agric.,* **58**, 253-260.
35. Wolz,S., Schormann,A., Putzer,K., Guerrand,D., and Fisher,U., 2004 : Color extraction and stability in *Pinot noir* wines from cool climate: impact of a new pectinase preparation. Poster presented at INTERVITIS @)), (Stutgard, Germany).
36. Clare,S., Skurray,G., Theaud,L., 2002: Effectof a pectolytic enzyme on the colour of red wine. *The Australian&New Zealand Grapegrower&Winemaker*, **456**, 29-35.
37. Haight,K.G., and Gump,B.H., 1994: The Use of Macerating Enzymes in Grape Juice Processing. *Am. J. Enol. Vitic.,* **45**(1), 113-116.
38. Madani, W., Kermasha, S., Goetghebeur, M., and Tse, M., 1997: Partial purification and characterization of a polyphenol esterase from *Aspergillus niger*. *Process Biochem*., **32**,61-69.
39. González SanJosé, M.L., Izcara, E., Pérez-Magariño, S., Revilla, I., 1998: *2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ecsoc-2),* [*http://www.mdpi.org/ecsoc/*](http://www.mdpi.org/ecsoc/)*, September 1-30,1998.*
40. Gump, B.H., Haight, G.T., 1995: A preliminary study of industrial enzyme preparations for colour extraction/stability in red wines. CATI Viticulture and Enology Research Centre.
41. Martino,A., Pifferi,P.G., and Spagna,G., 1994: The separation of pectinlyase from β-glucosidase in a commercial preparation. *J. Chem. Tech. Biotechnol.,* **61**, 255-260.
42. Voragen,A.G.J., and van den Broek,L.A.M., 1991 : Fruit juices. Ch. I, In: *Biotechnological Innovations in Food Processing.*, J. Green (Ed.), Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford.,187-210.
43. Pretorius,I.S., van Rensburg,P., Lambrechts,M.G., Vivier,M.A., van Zyl,W.H., 1996 : Genetic improvement of proteolytic and polysaccharolytic wine yeasts.  *Proceedings of the Eleventh International Oenological Symposium*. *E. Lemperle (Ed).,* 115-131. Internationale Vereinigung für Oenologie, Betriebsführung und Weinmarketing e.V.
44. Huang,H.T., 1955: Decolorization of anthocyanins by fungal enzymes. *J. Agric. Food. Chem*., **3**, 141-146.
45. Brimer,L., Cicalini,A.R., Federici,F., and Petrccioli,M., 1995: Beta-glycosidase as a side activity in commercial pectinase preparations of fungal origin. The hydrolysis of cyanogenic glycosides. *Ital. J. Food Sci.,* **4**, 387-394.
46. McCleary,B.V., and Harrington,J., 1988: Purification of β-D-glucosidase from *Aspergillus niger*. *Methods Enzymol.,* **160**, 575-583.
47. Unno,T., Ide,K., Yazaki,T., Tanaka,Y., Nakakuki,T., and Okada,G., 1993: High recovery purification and some properties of a β-glucosidase from *Aspergillus niger*. *Biosci. Biotech. Biochem.,* **57**(12), 2172-2173.
48. Wightman,J.D., and Wrolstrad,R.E., 1995: Anthocyanin analysis as a measure of glycosidase activity in enzymes for juice processing. *J. Food Sci.,* **60**, 862-867.
49. Wrolstrad,R.E., Wightman,J.D., and Durst,R.W.,1994: Glycosidase activity of enzyme preparations used in fruit juice processing. *Food Technol*., **48**(11), 90, 92-94, 96, 98.
50. Piffaut, B., Kader, F., Girardin, M., and Metche, M., 1994 : Comparative degradation pathways of malvidin 3,5-diglucoside after enzymatic and thermal treatments. *Food Chem*., **50**,115-120.
51. Canal-Llaubères,R.M., and Barbe,C., 1995: The use of purified pectolyc enzyme preparations for limiting the formation of volatile phenols in wine*. Am. J. Enol. Vitic.,* **46**, 416.
52. Johanides, V., Korčulanin, A., Marić, V., Divjak, S., and Vlašić, D., 1976: Proizvodnja vina vo : *Industriska mikrobiologija*, Tehnoloski fakultet, Zagreb, pp. 165-176.
53. Voragen, A.G.J., Schols, H., and Visser, R., 1995: Advances pectin and pectinase research (eds), Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp.47-59.
54. Vidal, S., Williams, P., O`Neil, M.A., Pellerin, P., 2001: Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, **45**(4), 315-329.
55. Cheynier, V., 2005 : Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrition,* **81**, 223S – 229S.
56. Joutei, K.A., 1994 : Localisation des tannins dans la pellicule de baie de raisin. *Vitis.,* **33,** 133-138.
57. Pinelo M., Arnous, A., Meyer, A. S., 2006 : Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release., *Trends Food Sci. Technol*., **17,** 579-590
58. Kennedy, J.A., Saucier, C.&Glories, Y., 2006 : Grape and wine phenolics: History and perspective. *American Journal of Enology and Viticulture.,* **57**(3), 239-248.
59. Cheynier, V., Duenas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J.M., Sarni-Manchado, P.&Fulcrand, H., 2006 : Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture*, **57**(3), 298-305.
60. Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 2000: Handbook of enology, Vol.2 : The chemistry of wine and stabilization and treatments, John Wiley&Sons Ltd., Chichester, p.141.
61. Somers, T.C., Verdette, E., 1988 : Phenolic composition of natural wine types. In: Linskens, H.F.&Jackson, J.F. (Eds.) *Modern methods of plant analysis, wine analysis.* Vol.6. Springer Verlag, Berlin, 219-257.
62. Bakker, J. & Clarke, R.J., 2004: Wine Flavour Chemistry, Oxford, Blackwell Publishing Ltd.
63. Basha, S.M., Musingo, M.&Colova, V.S., 2004 : Compositional differences in the phenolic compounds of muscadine and bunch grape wines. *African Journal of Biotechnology.,* **3**(10), 523-528.
64. Macheix,J.J., Fleuriet,A., and Billot,J., 1990 : Fruit Phenolics. CRC Press, Boca Raton, Florida.
65. Ribéreau-Gayon, P., 1965 : Identification d`esters des acides cinnamiques et l`acide tartarique dans les limbes et les baies de *Vitis vinifera*. *Comptes Rendus.,* **265,** 341-343.
66. Somers, T.C., Verdette, E.&Pocock, K.F., 1987 : Hydroxycinnamate esters of *Vitis* *vinifera*: Changes during white vinification, and effects of exogenous enzymatic hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture.,* **40**, 67-78.
67. Verdette, E., Noble, A.C.&Somers, T.C., 1988 : Hydroxycinamates of *Vitis vinifera*: Sensory assessment in relation to bitterness in white wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture.,* **45**, 267-272.
68. Sarni, P., Fulcrand, H., Souillol, V., Souquet, J.M.&Cheynier,V., !995 : Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must-like model solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture.,* **69,** 385-391.
69. Jackson,M.G., Timberlake,C.F., Bridle,P., and Vallis,L., 1978: Red wine quality: Correlations between colour, aroma and flavor and pigment and other parameters of young Beaujolais. *J. Sci. Fd. Agric.,* **29**, 715-727.
70. Somers, T.C., Evans,M.E., 1974 : Wine quality: correlations with colour density and anthocyanin equilibria in a group of young red wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture.,* ***25****, 1369-1379.*
71. Somers, T.C., 1978 : Interpretations of colour composition in young red wines. *Vitis.,* **17,** 161-167.
72. Furtado, P., Figueiredo, P., Chaves das Neves, H., and Pina, F., 1993:

Photochemical and thermal degradation of anthocyanins. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem*., **75**, 113-118.

1. Somers, T.C., Evans, M.E., 1977 : Spectral evaluation of young red wines: anthocyanin equilibria, total phenols, free and molecular SO2 and chemical age. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* **28,** 279-287.
2. Ribéreau-Gayon, P., Pontallier, P., Glories, Y., 1983: Some interpretations of colour changes in young red wines during their conservation. *J. Sci. Food Agric*., **34**, 505-516.
3. Timberlake, C.F., Bridle, P., 1976: Interactions between anthocyanins, phenolic compounds and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am. J. Enol. Vitic*., **27**, 97-105.
4. Romeyer, F.M., Macheix, J.J., Goiffon, J.P., Reminiac, C.C. & Sapis, J.C.,1983: The browning capacity of grapes. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric esters during development and maturation of the fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*., **31**, 346-349.
5. Singleton,V.L., and Draper,D.E.,& Rossi Jr, J.A., 1966: Paper chromatography of phenolic compounds from grapes, particularly seeds, and some variety-ripeness relationships. *American Journal of Enology and Viticulture.,* **17,** 206-217.
6. Haslam, E., 1998 : *Practical polyphenolics from structure to molecular recognition and physiological action,* Cambrige University Press, Cambridge.
7. Cheynier,V., Flucrand,H., Brossaud,F., Asselin,C., and Moutounet,M., 1999: Phenolic composition as related to red wine flavor. In “Chemistry of Wine Flavor”,eds. Waterhouse,A., and Ebeler,S., *American Chemical Society,* *Washington, DC*, pp. 124-141.
8. Bate-Smith, E.C., 1973: Haemanalysis of tannins: The concept of relative astringency.  *Phytochem*., **12**, 907-909.
9. Vidal,S., Francis,L., Guyot,S., Marnet,N., Kwiatkowski,M., Gawel,R., Cheynier,V., and Waters,E.J., 2003: The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium.,*J. Sci. Food Agric.,* **83**, 564-573.
10. Jakson,R., 2000: Wine, health, and food. In “Wine Science”, ed. Taylor,S., Academic Press, San Diego, pp. 591-607.
11. Singleton,V.L., and Draper,D.E., 1964: The transfer of polyphenolic compounds from grape seeds into wines. *Am. J. Enol. Vitic*., **15**, 34-40.
12. Oszmianski, J., Romeyer, F.M., Sapis, J.C.& Macheix, J.J., 1986 : Grape seed phenolics: Extraction as affected by some conditions occurring during wine processing. *American Journal of Enology and Viticulture.,* **37**(1), 7-12.
13. Meyer, B. & Hernandez, J.R., 1970 : Seed tannin extraction in Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture,* **21,** 184-188.
14. Herderich, M.J.& Smith, P.A., 2005 : Analysis of grape and wine tannins: Methods, applications and challenges. *Australian Journal of Grape and Wine Research.,* **11**(2), 205-214.
15. Haslam,E., 1980 : In Vino Veritas: Oligomeric procianidins and the ageing of red wines. *Phytochem.,* **19**, 2577-2582.
16. Peyrot des Gachons, C. & Kennedy, J.A., 2003 : Direct method for determining seed and skin proanthocyanidin extraction into red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.,* **51(**20), 5877-5881.
17. Downey, M.O., Harvey, J.S.& Robinson, S.P., 2003 : Analysis of tannins in seeds and skins of *Shiraz* grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research.,* **9**(1), 15-27.
18. Cerpa-Calderóne, F.K. & Kennedy, J.A., 2008 : Berry integrity and extraction of skin and seed proanthocyanidins during red wine fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.,* **56**(19), 9006 - 9014.
19. Souquet, J.M., Cheynier, V., Brossand, F. & Moutounet, M., 1996 : Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry.,* **42**(2), 509-512.
20. Ferreira, V., Escudre, A., Fernandez, P. & Cacho, J., 1997 : Changes in the profile of volatile compounds in wines stored under oxygen and their relatiom ship with the browning process. *Food Research and Technology.,* **205**(5), 392-396.
21. Oszmianski, J., Cheynier, V. & Moutounet, M., 1996 : Iron-catalyzed oxidation of (+)-catechin in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, **44**(1), 1712-1715.
22. Danilewicz, J.C., 2007 : Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system : Central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture.,* **58**, 53-60.
23. Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swasitand, P. & Glover, W., 1999 : Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*., **66**(4), 401-436.
24. Li, H., Guo, A. & Wang, H., 2008 : Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry.,* **108**(1), 1-13.
25. Waterhouse, A.L., & Laurie, V.F., 2006 : Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture.,* **57**(3), 306-313.
26. Службен весник на РМ, бр.69/2004: Правилник за класификација на сорти на грозје за производство на вино во РМ.
27. Службен весник на РМ, бр.50/2010: Закон за вино.
28. Glories, Y., 1984 : La couleur des vins rouges. 2me partie. Mesure, origine et interpretation. Conn. *Vigne Vin.,* **18(4)**, 253-271.
29. Pardo, F., Salinas, M. R., Alonso, G. L., Navarro, G., Huerta, M. D., 1999 : Effect of diverse enzyme preparations on the extraction and evolution of phenolic compounds in red wines., *Food Chem.,* **67**, 135-142.
30. Ivanova, V., Stefova, M., Chinnici, F., 2010: Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. *J. Serb. Chem. Soc.,***75**, 45-59.
31. Slinkar, K., and Singleton, V.L., 1977: Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic.,* **28**, 9-55.
32. Di Stefano, R., and Cravero, M.C., 1989: I composti fenolici e la natura del colore dei vini rossi. *L’enotecnico Ottobre*, 81-87.
33. Zhishen, J., Mengcheeneg, T., and Jianming, W., 1999: The determination of flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.,* **64**, 555-559.
34. Di Stefano, R., and Cravero, M.C., Gentilini, N., 1989: Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. *L’enotecnico I. Maggio,* 83-89.
35. Службен весник на РМ, бр.54/2002: Закон за безбедност на храната и на производите и материјалите што доаѓаат во контакт со храната.
36. Службен лист на СФРЈ, бр.45/83: Правилник за микробиолошка исправност на намирници во промет.