

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
Fakulta chemická
Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí

Ing. Dana Čapounová

**VYUŽITÍ PEKTOLYTICKÝCH ENZYMŮ PŘI VÝROBĚ
ČERVENÉHO VÍNA**

**USE OF PECTIC ENZYMES DURING PRODUCTION
OF RED WINE**

ZKRÁCENÁ VERZE PH.D. THESIS

Obor: Chemie potravin a biotechnologie

Školitel: Prof. Ing. Milan Drdák, DrSc.

Oponenti: Prof. Ing. Jan Goliáš, DrSc.

Ing. Štefan Bálint

Datum obhajoby: 17. 12. 2002

KLÍČOVÁ SLOVA

červené víno, vinařské technologie, pektolytické enzymy, antokyany

KEY WORDS

red wine, wine technology, pectic enzymes, anthocyanins

MÍSTO ULOŽENÍ PRÁCE

Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí,
Fakulta chemická, VUT v Brně

© Dana Čapounová, 2003

ISBN 80-214-2410-9

ISSN 1213-4198

Obsah

1	ANTOKYANY	5
1.1	Struktura antokyanů	5
1.1.1	<i>Vliv pH na strukturu antokyanů</i>	5
1.1.2	<i>Vliv teploty na antokyanů</i>	6
1.1.3	<i>Vliv SO₂ na antokyanů</i>	6
1.2	Lokalizace antokyanů	6
2	ČERVENÉ VÍNO	7
2.1	Nakvácení hroznů	7
2.2	Zrání a stárnutí vína	8
2.3	Význam vína ve výživě člověka	8
3	ENZYMOVÉ PŘÍPRAVKY	8
3.1	Využití enzymových přípravků ve vinařské technologii	10
4	CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE	10
5	ZVOLENÉ EXPERIMENTÁLNÍ POSTUPY	11
5.1	Materiál	11
5.2	Přístroje	11
5.3	Metody	11
5.3.1	<i>Stanovení antokyanů</i>	11
5.3.2	<i>Identifikace antokyanů metodou HPLC</i>	11
5.3.3	<i>Stanovení tepelné stability antokyanů</i>	12
5.3.4	<i>Měření rychlosti filtrace</i>	12
5.3.5	<i>Stanovení enzymových aktivit</i>	13
5.4	Matematicko-statistické metody	13
6	VÝSLEDKY A DISKUSE	14
6.1	Výsledky experimentů realizovaných v průmyslovém měřítku	14
6.1.1	<i>Uvolňování antokyanů během nakvácení rmutu</i>	14
6.1.2	<i>Uvolňování fenolických látek během nakvácení rmutu</i>	15
6.1.3	<i>Rychlost filtrace</i>	15
6.1.4	<i>Charakteristiky enzymových preparátů</i>	16
6.1.5	<i>Stanovení významných enzymových aktivit</i>	17
6.1.6	<i>Další senzoričky aktivní látky</i>	17
6.2	Experimenty realizované v laboratorním měřítku	18
6.2.1	<i>Uvolňování antokyanů během nakvácení rmutu</i>	18
6.2.2	<i>HPLC analýza vzorků rmutu</i>	18
6.2.3	<i>Zákal ve vzorcích rmutu</i>	19
6.2.4	<i>Uvolňování fenolických látek během nakvácení rmutu</i>	20
6.2.5	<i>Rychlost filtrace</i>	21
6.2.6	<i>Sedimentace</i>	21

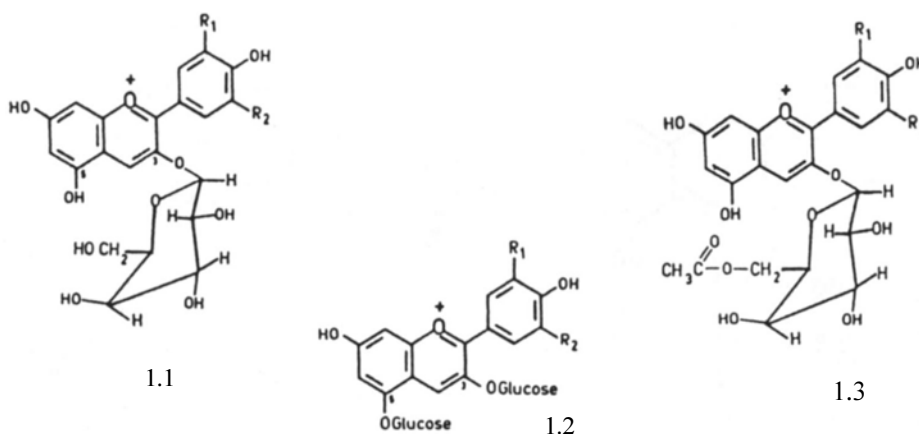
6.2.7	<i>Stanovení enzymových aktivit pektolytických preparátů</i>	22
6.2.8	<i>Degradace antokyanových barviv</i>	23
6.2.9	<i>Porovnání enzymových preparátů</i>	25
7	ZÁVĚR.....	26
8	LITERATURA	27
9	PŘÍLOHA	29
10	ŽIVOTOPIS.....	30
11	SEZNAM AKTIVIT A PUBLIKACÍ	31
	ABSTRACT	32

1 ANTOKYANY

1.1 STRUKTURA ANTOKYANŮ

Antokyany patří do skupiny červených až modrofialových přírodních barviv rozpustných ve vodě. Tyto heteroglykosidy obsahují dvě části: složku barevnou - **aglykon** a složku cukernou. Barevný aglykon je nazýván **antokyanidin**. S rostoucí hydroxylací nebo metoxylací aglykonu, nabývají antokyany fialovější barvu. Aglykon je vázán glykosidickou vazbou na cukernou složku, kterou bývá nejčastěji D-glukóza, D-galakóza, méně L-arabinóza a L-rhamnóza (obr.1).

Často u těchto sloučenin dochází k **acylaci** kyselinami (kumarovou, octovou, jablečnou, parahydroxybenzoovou, atd.) na již vázaný cukr v poloze 3. Glykosidace ve třetí poloze řídí rozpustnost a stabilitu aglykonu. Pro kultivary evropské révy *Vitis vinifera* je charakteristická přítomnost delphinidinu, petunidinu, malvidinu a monoglukosidů jednotlivých antokyanidinů, zatímco ostatní druhy *Vitis* se vyznačují také velkým množstvím 3,5-diglukosidů a jejich acylovaných derivátů^{1, 2, 3, 4}.



Obr.1.1: Antokyanin-3-monoglukosid²,

obr.1.2: antokyanin-3,5-diglukosid

obr 1.3: antokyanin-3-(6-O-acetylglukosid)

1.1.1 Vliv pH na strukturu antokyanů

Velmi důležitým faktorem, který ovlivňuje intenzitu a barevný odstín antokyanů je pH prostředí. V závislosti na pH existuje několik barevných forem antokyanů⁵. Při hodnotách do pH=1 se antokyany vyskytují v červené kationtové formě. Zvyšováním pH prostředí se červená barva antokyanů vytrácí. Dochází k hydrataci spojené s deprotonací až na karbinolovou pseudobázi. Po hydrolýze karbinolové pseudobáze dojde k její izomerizaci na 3-ketoformu. Při dalším zvýšení pH se modré

chinoidní anhydrobáze recyklizují a ionizují za vzniku červeno-fialově zbarveného roztoku. Při pH=8 vzniká barva tmavě modrá ionizací anhydrobáze nebo žlutá, jestliže dojde k vytvoření chalkonu .

1.1.2 Vliv teploty na antokyany

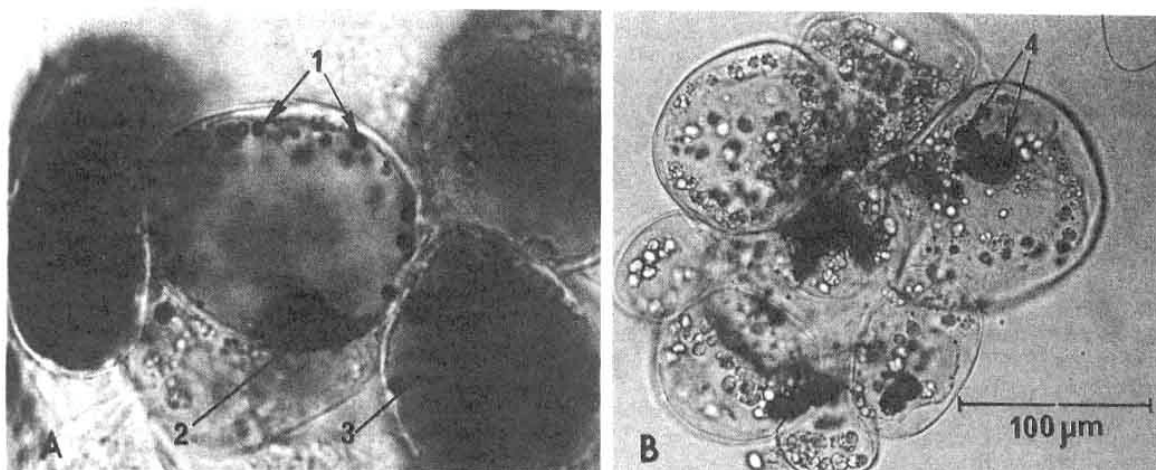
Ovlivnění struktury antokyanů teplotou je závislé na mnoha faktorech prostředí. Vedle hodnoty pH je to přítomnost kyslíku, oxidu siřičitého, oxidu uhličitého nebo světla. Degradace antokyanů je v nepřítomnosti kyslíku v oblasti hodnot pH 2,0 - 4,5 prakticky na pH nezávislá a zpravidla probíhá za aerobních i anaerobních podmínek jako reakce I. řádu^{5,6}. Obecně nejprve dochází působením teploty k pomalé hydrolyze a ke štěpení glykosidické vazby v poloze 3. Vznikají příslušné aglykony a cukry. Dochází ke zvýšení barevné intenzity a k následnému poklesu vlivem menší stability vzniklých aglykonů. Aglykony podléhají transformaci na chalkony a další degradaci.

1.1.3 Vliv SO₂ na antokyany

Oxid siřičitý se ve vinařství uplatňuje jako antioxidant. Z prostředí odebírá kyslík, oxiduje se na SO₃, snižuje hodnotu rH. U antokyanových barviv dochází v důsledku jeho přítomnosti k odbarvení^{4,8}.

1.2 LOKALIZACE ANTOKYANŮ

U většiny u nás pěstovaných kultivarů révy vinné se červené barvivo vyskytuje v buňkách slupek bobulí modrých kultivarů. Mikroskopická pozorování buněk hypodermálních částí tkání různých druhů rév poukázala na výskyt pevnějších tělísek, ve kterých jsou antokyaninové pigmenty umístěny. Nachází se v cytoplazmě buněk slupky bobule, nebo v jejich vakuolách. V révách *Vitis vinifera* byla přítomnost těchto tzv. **antokyanoplastů** popsána. Antokyanoplasty se mohou vyskytovat buď jako malé jednoduché cytoplazmatické antokyanoplasty nebo může docházet k jejich koalescenci za vzniku velkých vakuolárních antokyanoplastů (obr. 2)⁷.



Obr. 2: Fotomikrograf buněčné suspenze *Vitis vinifera* (x250)⁷.

(A) Buňky s pigmentovanými vakuolami;

1, malé (cytopazmatické) antokyanoplasty;

2, koaleskující antokyanoplasty;

3, velké (vakuolární) antokyanoplasty.

(B) Antokyanoplasty v buňkách s nepigmentovanými vakuolami.

2 ČERVENÉ VÍNO

Zralé bobule se melou ve speciálních mlýncích na kašovitou hmotu zvanou rmut. Jeho scezením se získá samotok. Rmut se lisuje, získává se mošt. Ten obsahuje vodu, sacharidy, kyseliny, třísloviny, dusíkaté látky, vitamíny, barviva, aromatické látky a minerální látky. Lze ho upravovat sířením, provzdušňováním, odkalováním, okyselením, odkyselením, přidáním čířidla nebo přidáním cukru.

2.1 NAKVÁŠENÍ HROZNŮ

Při výrobě červeného vína je žádoucí získat z hroznů maximální množství červeného barviva, jakož i přiměřený obsah tříslovin. Nakvácením modrých odrůd dochází účinkem alkoholu syntetizovaného kvasinkami k vyloučení barviv ze slupek přímo do rmutu. Optimální doba nakvácení se u červených odrůd pohybuje v závislosti na teplotě, která bývá 20 až 25°C, a požadovaném charakteru vyráběného vína od 8 do 16 dnů. Velmi dlouhé nakvácování není pro barvu červeného vína přijatelné, neboť získané barvivo se znovu rozkládá a červená barva hnědne. Při nakvácení jsou tuhé částice nadnášeny a vytvářejí na povrchu moštu matolinový klobouk. Ten je nutno udržet ponořený v moštu, aby se zabránilo jeho styku se vzduchem a rozvoji nežádoucí mikroflóry. Ztrátám barviv účinkem polyfenol-oxidázy a bakteriální kontaminaci lze zabránit mírným zasířením, např. posypem povrchu rmutu disiřičitanem draselným^{9, 10, 11, 12}.

2.2 ZRÁNÍ A STÁRNUTÍ VÍNA

Polyfenoly vína podstupují během procesu zrání polymerizační změny. Dochází ke změnám v barvě vína, které odráží přechod antokyanů na stabilnější polymerní formy, kterým je přičítáno na 50 % barevné hustoty jednoletých vín. Vlivem těchto přeměn se mění chuť a vůně vína, snižuje se svíravost^{13,14,15}. Nejčastější reakce odpovědné za tvorbu polymerních barviv zahrnují kondenzaci, kopigmentaci a samoasociaci. Vedou ke zvýšení množství barevných komplexů, které jsou méně citlivé ke změnám pH než samostatné antokyany. Jejich stabilita a reaktivita ve víně je ovlivněna mnoha faktory, jako je množství kyslíku, SO₂, acetaldehydu, teploty, pH a koncentrace molekul se schopností kopigmentovat^{16, 17, 18, 19}.

2.3 VÝZNAM VÍNA VE VÝŽIVĚ ČLOVĚKA

Víno je považováno za hodnotný nápoj. Kromě základních součástí obsahuje víno řadu mikroelementů, jako je měď, železo, kobalt, mangan, bor, jod a jiné, které spolupůsobí při výměně látek v lidském organismu jako biokatalyzátory aktivující činnost hormonů a enzymů. V posledních letech vzrůstá zájem o víno z hlediska jeho možného příznivého preventivního působení proti kardiovaskulárním onemocněním (*CHD-Coronary Heart Disease*). Četné studie prokázaly, že nepřímo úměrně je s výskytem CHD spojena koncentrace HDL cholesterolu (*lipoprotein o vysoké hustotě*), jehož množství při pravidelné konzumaci malého množství alkoholu vzrůstá²⁰.

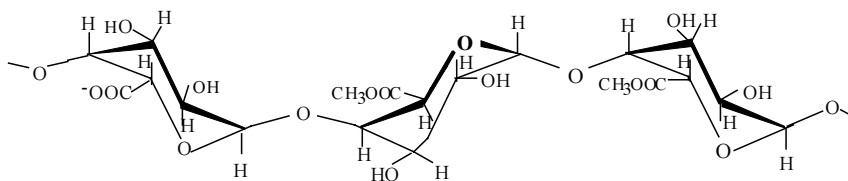
3 ENZYMOVÉ PŘÍPRAVKY

Přírozenou komponentou všech rostlin je **pektin**. Je důležitou součástí primárních stěn rostlinných buněk. Dále tvoří hlavní složku střední vrstvy extracelulárního materiálu, který se nachází mezi primárními stěnami sousedních, především mladých rostlinných buněk.

V ovocných šťávách bývá obvykle přítomno 0,05 - 0,20 % pektinu. Pektiny brání, zejména jsou-li přítomny ve značné míře, různým čišícím zákrokům a úpravám. Je tedy účelné zbavit pektin jeho dispergačních, resp. emulgačních vlastností již před filtrací, aby mohly disperze vločkovat a snadno se zachytit na filtrech. V této souvislosti je tedy nutné zdůraznit, že vlastním úkolem enzymů není odkalení šťávy, ale právě jen inaktivace stabilizátoru kalových látek a dosažení stavu, kdy mohou být kaly vysráženy a teprve jako vločky zachyceny ekonomickou filtrací nebo vyloučeny odstředěním, sedimentací, či jinak²¹.

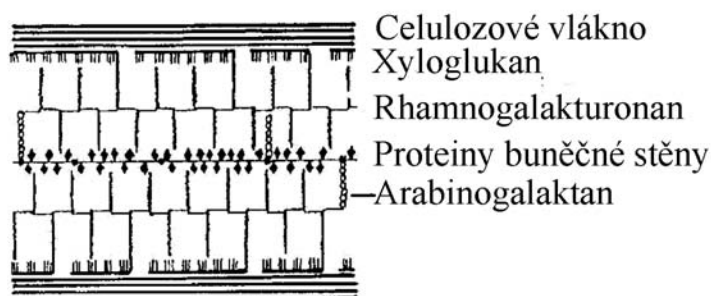
Chemicky jsou **pektinové látky** větvené heteropolysacharidy obsahující stovky či tisíce stavebních jednotek v molekule (obr.3). Základ tvoří kyselina polygalakturonová, která je metylesterifikována. Pektin je heteropolysacharid, jehož hlavní řetězec se skládá z jednotek D-galaktopyranuronové kyseliny vázané α -(1,4) glykosidickými vazbami a z malého množství jednotek L-ramnózy vázané α -(1,2)

vazbami. Součástí molekuly pektinu jsou i další neutrální sacharidy L-arabinóza, D-galaktóza, D-xylóza, D-glukóza.



Obr. 3: Struktura polygalakturonového řetězce

Buněčná stěna rostlinné buňky je tvořena vlákny, jejichž složení se mění v závislosti na jejich vzdálenosti od středové vrstvy přes primární a sekundární buněčnou stěnu. Složení jednotlivých vrstev je velice rozdílné. Střední vrstva se skládá především z protopektinu a hemicelulóz (obr. 4)^{22, 23}.



Obr. 4 : Složení středové vrstvy mezi stěnami rostlinných buněk²⁴

Pektinové látky jsou přirozeným substrátem pro **pektolytické enzymy**. Ty lze rozdělit do jednotlivých skupin dle místa, kde atakují galakturonový řetězec molekuly pektinu.

Existují tři základní typy pektolytických enzymů^{22, 23, 25}:

- ◆ Deesterifikující enzymy (pektinesterázy)
- ◆ Depolymerizující enzymy (pektinázy: hydrolázy a lyázy)
- ◆ Protopektinázy

Pektinesterázy katalyzují deesterifikaci methoxylové skupiny pektinu za tvorby kyseliny pektinové. Jsou produkovány plísněmi, bakteriemi, kvasinkami a vyššími rostlinami. **Depolymerázy** štěpí $\alpha(1\rightarrow4)$ -glykosidické vazby mezi galakturonovými monomery v pektinových látkách buď hydrolýzou (hydrolázy) nebo β -eliminací (lyázy). Užívané prefixy endo- a exo- potom značí náhodný nebo koncový atak

molekuly. **Protopektinázy**, které štěpí protopektin (nerozpustný nativní pektin buněčných stěn asociovaný s celulosou), uvolňují ve vodě rozpustný a vysoce polymerizovaný pektin z protopektinu²⁶.

Vedle pektolytických enzymů jsou v komerčních pektolytických preparátech velice často přítomny enzymy s **β-glukosidázovou** aktivitou. Ty katalyzují hydrolyzu alkyl- a aryl- β-glukosidů, také však diglukosidů a oligosacharidů. Dále jsou v enzymových preparátech přítomny **celulázy**, které štěpí celulosu. Enzymové přípravky, běžně dostupné v maloobchodní síti, vedle výše zmíněných, mohou obsahovat dále různá množství proteáz, amyláz, arabináz a galaktomannáz. Přípravky jsou k dostání v tekuté nebo pevné formě.

3.1 VYUŽITÍ ENZYMOVÝCH PŘÍPRAVKŮ VE VINAŘSKÉ TECHNOLOGII

Některé práce uvádějí, že extrakce barviv a dalších fenolických látek je po aplikaci enzymových preparátů zvýšena asi o 12 %, výtěžnost šťávy vzrůstá v průměru o 6 %. Při sensorických zkouškách nebyly objeveny významné odlišnosti v chuti vína. Pektinázy umožňují:

- ◆ Intenzivnější extrakci barevných látek^{23, 27, 28}.
- ◆ Snadné lisování zejména odrůd s pevnou dužninou^{27, 28}.
- ◆ Snadné čiření a odkalování moštů²¹.
- ◆ Rychlejší sedimentaci kalů ve vínech
- ◆ Zvýšenou extrakci vonných látek^{29, 30, 31}.

4 CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem disertační práce je charakterizace a porovnání komerčních preparátů pektolytických enzymů, které jsou využívány při výrobě červeného vína. Budou sledovány aspekty:

1. Zvýšení extrakce antokyanových pigmentů a fenolických látek do rmutu během prefermentace, sledování změn v obsahu dalších sensoricky aktivních látek vína.
2. Intenzifikace procesu štěpení pektinových látek sledováním doby filtrace vzorků a rychlosti čistění vína.
3. Možnost ovlivnění stability barvy vína.

V pektolytických preparátech budou dále stanoveny aktivity enzymů: pektin-methylesterázy, polygalakturonázy, pektinlyázy a celulázy.

Na základě dosažených výsledků analýz vzorků rmutů a vín a složení enzymových preparátů, budou vyvozeny základní charakteristiky použitých enzymových preparátů.

5 ZVOLENÉ EXPERIMENTÁLNÍ POSTUPY

5.1 MATERIÁL

Po dohodě se zástupci vinařské společnosti byl pro experimenty použit rmut vyrobený z modrých hroznů odrůdy Frankovka, které byly vypěstovány převážně v Mikulovské vinařské oblasti. Rmut byl vyroben tradičním postupem - mletím a odzrněním hroznů.

V experimentech byly použity následující enzymové přípravky: Gammapect Mall, Gammapect Press 2L, Trenolin Rouge DF, Gammapect AWP, Gammapect W2L, Gammapect W70L, Ovipres, Trenolin Rot, Vinozym G, Vinoflow.

5.2 PŘÍSTROJE

Absorbance byly měřeny použitím UV-VIS spektrofotometru HITACHI U-3000, Helios α a Helios δ . K identifikaci antokyanů bylo užito kapalinového chromatografu LC-10AD SCHIMADZU. V experimentech byl dále použit termostat U 10 a Ubbelohdeho viskozimetr.

5.3 METODY

5.3.1 Stanovení antokyanů

Na spektrofotometrické stanovení vybraných chemických charakteristik vína byly použity ověřené metody^{32, 33, 39}.

Nejprve byly měřeny hodnoty absorbancí za použití 10 mm kyvet a zaznamenány hodnoty A_{420} , A_{520} a A_{660} .

Dále bylo přidáno 50 μ l vína k 5 ml 1 M HCl a po 3 – 4 hodinách zaznamenána absorbance při 280 nm A_{280}^{HCl} .

5.3.2 Identifikace antokyanů metodou HPLC

Vzorky vín byly analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s cílem identifikace přítomných antokyanů a jejich derivátů. Protože nebyly k dispozici standardní roztoky, bylo nutno kvalitativní zastoupení barviv určit pouze srovnáním retenčních časů jednotlivých píků na obdrženém chromatogramu a retenčních časů barviv analyzovaných již dříve, za stejných podmínek^{34, 35, 36}. Při separaci bylo použito následujícího vybavení a postupů:

Kolona: Sepharon SGX C 18, 150 mm \times 3,3 mm, průtok: 0,5 ml/min, vlnová délka: 520 nm, nástřík: 20 μ l.

Rozpouštědlo A: 20 % CH ₃ OH + 80 % H ₂ O + HClO ₄				
Rozpouštědlo B: 80 % CH ₃ OH + 20 % H ₂ O + HClO ₄				
C (HClO ₄) = 0,0251 mol/l ~ pH 1,6				
% B		Gradientový program		
Začátek	Konec	čas (min)	vzrůst B/min	% B
20 %	75 %	0 - 20	1 %	20 - 40
		20 - 30	2 %	40 - 70
		35 - 40	1 %	70 - 75

Tab. 1: Gradientový program pro separaci antokyanů

5.3.3 Stanovení tepelné stability antokyanů

Degradace antokyanových barviv byla sledována při teplotách 21, 37, 60 a 90 °C. Z lahví byla pipetována potřebná množství vína do zkumavek, které byly umístěny do termostatu, vytemperovaného na požadovanou teplotu. Ze zkumavek byly v předem určených časových intervalech odebrána potřebná množství k analýze. Stabilita barviv byla posuzována spektrofotometricky ve viditelné oblasti spektra na základě změn obsahu barviv. Na stanovení obsahu antokyanových barviv byla použita metoda diferenčního pH⁵.

Obsah antokyanů c_{AK} v g/l:

$$c_{AK} = \frac{\Delta A \times M_V \times V}{V_{vz} \times 1 \times \varepsilon}$$

kde $\Delta A = \bar{A}_{pH\ 1,0} - \bar{A}_{pH\ 4,5}$,

$A_{pH\ 1,0}$ – průměrná absorbance roztoku s pH 1,0 při 518 nm,

$A_{pH\ 4,5}$ – průměrná absorbance roztoku s pH 4,5 při 518 nm,

M_V – molekulová hmotnost kyanidin-3-glukosidu /449 g . mol⁻¹/,

V_{vz} – objem vzorku v cm³,

V – objem vzorku po zředění v cm³,

1 – tloušťka kyvety v cm,

ε - molární absorpční koeficient kyanidin-3-glukosidu
(26 900 dm³ . mol⁻¹ . cm⁻¹).

5.3.4 Měření rychlosti filtrace

Z nakvášecích jímek, popř. z experimentálních lahví bylo odebráno cca 50 ml kapalného podílu vzorku, který byl filtrován přes skládaný filtr Filpap KM-1. Byl zaznamenán čas, během kterého byl přefiltrován stanovený objem vzorku.

5.3.5 Stanovení enzymových aktivit

Byla stanovena aktivita polygalakturonázy, pektinesterázy, pektinlyázy a celulózy dle doporučených postupů^{37, 38}.

5.4 MATEMATICKO-STATISTICKÉ METODY

Přesnost použitých metod byla posouzena na základě výpočtu směrodatné a relativní chyby Sx a δx na hladině spolehlivosti 90%. Pro statistické zpracování stanovovaných hodnot byly použity následující vztahy:

Aritmetický průměr:
$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Směrodatná odchylka aritmetického průměru:
$$Sx = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

Interval spolehlivosti
$$I = Sx \cdot t_{v,p}$$

Relativní chyba (%)
$$\delta x = \frac{I}{\bar{x}} \cdot 100$$

Kde: x_i - naměřené hodnoty

\bar{x} - průměrná hodnota série měření

n - počet měření

$t_{v,p}$ - Studentův koeficient odpovídající stupni volnosti v a hladině pravděpodobnosti p .

Metoda nejmenších čtverců:

Pomocí metody nejmenších čtverců je k empirickým hodnotám závislostí (x_i, y_i), kde $i=1, 2, \dots, n$, přiřazena funkční závislost $y=f(x, b_1, b_2, \dots, b_p)$ tak, aby suma ploch čtverců o stranách ($y_i - y$) byla minimální.

$$S = \sum_{i=1}^n [y_i - f(x_i, b_1, b_2, \dots, b_p)]^2 = \min$$

Matematicky se tento požadavek formuluje: $\frac{\partial S}{\partial b_j} = 0$ pro $j=1, 2, \dots, p$

což je soustava p rovnic o p neznámých b_1, b_2, \dots, b_p .

Lineární regrese:

V případě lineární závislosti $y = k \cdot x + q$ má funkce f v metodě nejmenších čtverců tvar: $f(x, b_1, b_2)$ kde $b_1 = q$ a $b_2 = k$.

Z požadavku minimálních ploch čtverců vyplývá pro koeficienty k, q vztah lineární regrese dané soustavou dvou rovnic:

$$k \sum_{i=1}^n x_i^2 + q \sum x_{i\cdot} = \sum x_i y_i$$

$$k \sum x_{i\cdot} + qn = \sum y_i$$

V práci je použita hodnota korelačního koeficientu lineární regrese r :

$$r = \sqrt{1 - \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{\sum y_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}}$$

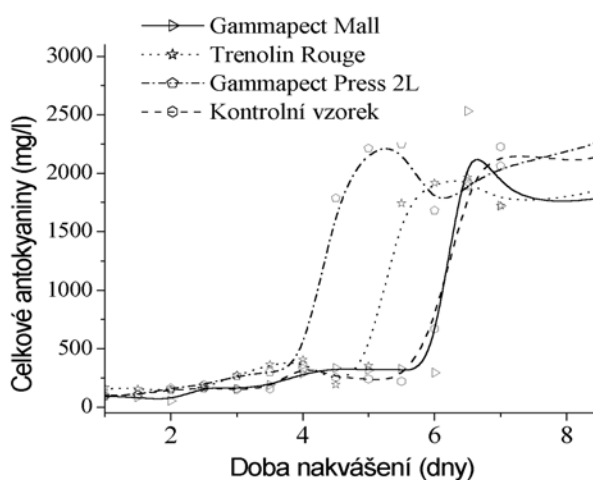
Hodnoty všech koeficientů lineární regrese byly počítány programem *Origin 6*.

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

6.1 VÝSLEDKY EXPERIMENTŮ REALIZOVANÝCH V PRŮMYSLOVÉM MĚŘÍTKU

6.1.1 Uvolňování antokyanů během nakvášení rmutu

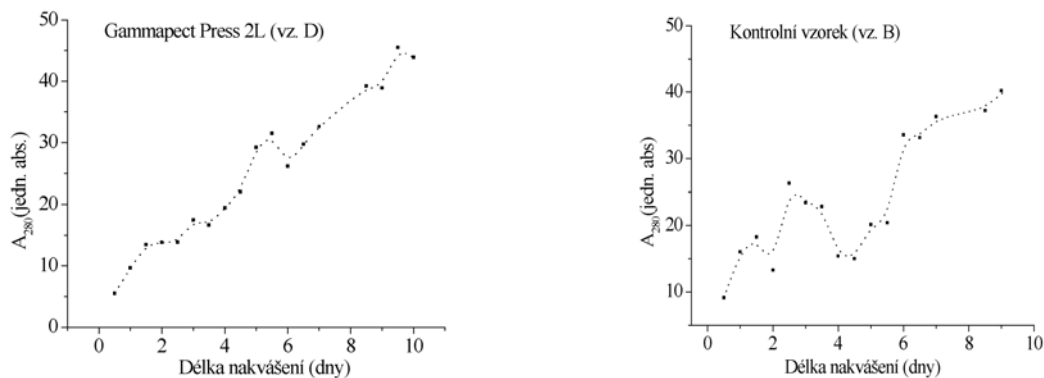
Během nakvášení jsou uvolňovány pigmenty do media v podobě monosacharidů a disacharidů nebo mohou být cukerného zbytku zbaveny úplně. U vzorku, při jehož přípravě byl použit enzymový preparát Gammapect Press 2L, došlo k uvolnění barviv o 2 dny dříve, než u vzorku kontrolního. To by mohlo poukazovat na přítomnost β - D - gluosidázové aktivity, jejíž přítomnost je garantována výrobcem. Také při použití enzymového preparátu Trenolin Rouge DF došlo k dostatečnému uvolnění barviv do šesti dnů od počátku nakvášení. Pro získání stejného množství barviva byla nezbytná doba nakvášení rmutu kontrolního a rmutu upraveného preparátem Gammapect Mall 7 dnů. Relativní chyby stanovení hodnot A_{520} se pohybovaly v rozmezí 5,5 - 11 %.



Obr. 5: Uvolňování antokyanových barviv do rmutu

6.1.2 Uvolňování fenolických látek během nakvácení rmutu

Na stanovení celkových fenolů ve víně byla použita všeobecně přijatá metoda měření absorpance při 280 nm. Nefenolickým látkám ve vínech při měření absorpance při 280 nm v 1 cm kyvetě je přisouzena hodnota $3,9 \pm 0,2$, což opravňuje k rutinnímu využití spektrální hodnoty $A_{280} - 4$ pro přímé měření fenolických látek v červeném víně³².



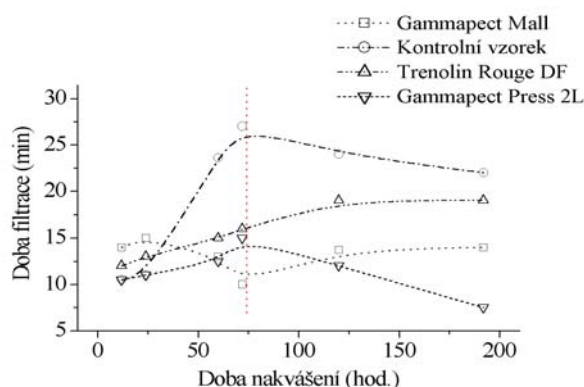
Obr. 6: Uvolňování fenolických látek během nakvácení modrého rmutu

U vzorků upravených enzymovým preparátem (např. vz. D. - obr. 6) bylo uvolňování fenolických látek s časem téměř lineární. Fenoly v těchto vzorcích byly uvolňovány rovnoměrně, plynulá mohla být také následná tvorba produktů antokyanů a dalších fenolů, vedoucí později k vyšší stabilitě barvy vína. U vzorku kontrolního bylo stanovované množství fenolických látek během nakvácení značně nevyrovnané.

Nejnižší množství celkových fenolů bylo po pěti dnech nakvácení uvolněno do kontrolního rmutu. Obsah fenolických látek ve vzorcích rmutu s přidávanými preparáty byl vyšší, což je způsobeno intenzivnějším štěpením polysacharidů buněčných stěn enzymy a tím usnadněnou extrakcí těchto látek. Relativní chyby stanovení hodnot A_{280} se pohybovaly v rozmezí 3,9 - 10,7 %.

6.1.3 Rychlost filtrace

Při nakvácení se mění struktura stěn buněk slupek bobulí. Během této doby dochází k výrazným změnám ve složení rmutu. Použité pektolytické preparáty se vzájemně liší ve složení a tím i účinnosti, jednotlivé enzymy přítomné v preparátech se mohou vzájemně ovlivňovat. Děje probíhající během nakvácení tedy nelze přesně popsat. Na základě měření rychlosti filtrace je možné částečně jejich činnost odhadnout.



Obr. 7: Změna doby filtrace vzorků rmutu během nakvášení.

Během prvních 3 dnů se projevuje činnost přítomné pektin-lyázové aktivity. U vzorků, do nichž byl aplikován preparát se stanovenou nízkou PL aktivitou, doba filtrace v této fázi nakvášení vzrůstá (např. u kontrolního vzorku a naopak. Od 3. dne ovlivňuje rychlost filtrace spíše přítomná celulólytická aktivita. U vzorků po aplikaci enzymového preparátu s nízkou aktivitou CE je filtrace rychlejší, vysoká celulólytická aktivita (např. u Trenolin Rouge DF) ovlivňuje rychlost filtrace negativně. U kontrolního vzorku byla aktivita pektinlyázy i celulózy, oproti vzorkům upraveným enzymy, nízká. Relativní chyby stanovení doby filtrace se pohybovaly v rozmezí 10 - 15 %.

6.1.4 Charakteristiky enzymových preparátů

Na základě dosažených výsledků jsme u použitých enzymových preparátů dospěli k následujícím závěrům:

Gammapect Mall - vhodná kombinace enzymových aktivit se projevuje rychlým štěpením pektinových látek na krátké sacharidové řetězce. Filtrace je po aplikaci tohoto preparátu rychlejší. Použití preparátu zvyšuje extrakci barviv, tento proces ovšem neurychluje. Pravděpodobně zvyšuje také extrakci fenolických látek.

Trenolin Rouge DF - vysoká celulólytická aktivita způsobuje dokonalé rozrušení stěn buněk slupek bobulí, zpřístupňuje pektin pro činnost dalších pektolytických enzymů. Jejich aktivity ovšem nejsou příliš vysoké. Pektiny během nakvášení nejsou dobře štěpeny, filtrace je urychlena pouze v malé míře. Tento preparát urychluje extrakci barviv, nezvyšuje intenzitu barvy rmutu.

Gammapect Press 2L - předpokládaná vysoká β -glukosidázová aktivita urychluje proces extrakce barviv a aromatických látek. Výrazně snižuje dobu filtrace šťávy. Aktivity pektin-methylesterázová, endogalakturonová a celulólytická jsou v tomto preparátu nízké.

U **kontrolního vzorku** je pro dosažení stejné intenzity zbarvení rmutu jako u vzorků upravených preparáty nutná delší doba nakvášení. Doba filtrace kontrolních vzorků je nesrovnatelně vyšší.

6.1.5 Stanovení významných enzymových aktivit

U pektolytických přípravků, které byly použity v tomto experimentu, a které jsou určeny k výrobě vína, byly stanoveny aktivity enzymů významných z hlediska technologického procesu.

Nejvyšší celulóзовou aktivitu vykazoval preparát Trenolin rouge DF. V případě preparátů Gammapect Mall a Gammapect Press 2L byly stanovené hodnoty celulóзовé aktivity podobné (tab.2.).

Enzymové přípravky	Lyázová aktivita	Celulolytická aktivita
	Přírůstek abs. A ₂₃₅ (min ⁻¹ .ml ⁻¹)	Redukující skupiny (min ⁻¹ .ml ⁻¹)
Gammapect MALL(A)	0,58	8,15.10 ⁻³
Trenolin Rouge DF (C)	- ^{ns}	4,16
Gammapect PRESS 2L(D)	0,46	2,51.10 ⁻³

^{ns} ...nestanoveno

Tab. 2: Hodnoty stanovených enzymových aktivit použitých preparátů pektolytických enzymů.

6.1.6 Další senzoričky aktivní látky

V případě použitého preparátu Trenolin Rouge DF byla naměřena výrazně vyšší celulóзовá aktivita, která umožnila dokonalejší štěpení buněčných stěn a zpřístupnila polysacharidy účinku dalších enzymů. Tento výsledek odpovídá i stanoveným vyšším hodnotám celkového extraktu u vzorku C. Obsah celkového extraktu zjištěný v kontrolním vzorku na začátku kvašení byl nízký.

Množství organických kyselin nebylo z hlediska působení pektolytických enzymů ovlivněno.

Senzoričky účinná látka (Stand. odchylka průměru)	Redukující Cukry (2,9-12,5 %)	Titovatelné kyseliny (1,7-11.0 %)	Celkový Extrakt (1,6-12,9 %)
Gammapect Mall	84,9	9,1	40,5
Trenolin Rouge DF	92,4	9,5	64,5
Gammapect Press 2L	44,4	9,4	42,0
Kontrolní vzorek	41,5	8,8	40,4

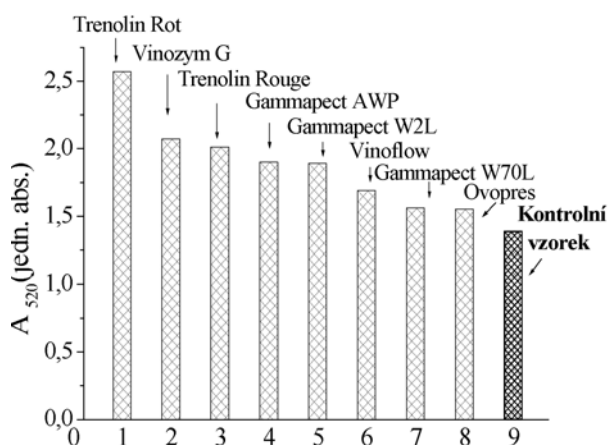
Tab. 3: Obsah redukujících cukrů, kyselin a celkového extraktu na počátku kvašení vína.

6.2 EXPERIMENTY REALIZOVANÉ V LABORATORNÍM MĚŘÍTKU

Sledované vlastnosti vzorků vín v těchto experimentech nemohou být srovnávány s hodnotami, které by byly stanoveny u reálných vín, neboť rmut, z něhož byly vzorky vín připraveny byl dávkován do experimentálních nádob dle potřeb experimentů a možností laboratoře. Rmut i víno byly vyrobeny stejným technologickým postupem jako v předchozím experimentu.

6.2.1 Uvolňování antokyanů během nakvácení rmutu

Uvolňování antokyanových pigmentů bylo zaznamenáno vždy během prvních 7 dnů nakvácení po aplikaci pektolytických preparátů. Při sledování množství antokyanů během experimentů v jednotlivých vzorcích rmutu byl u všech zaznamenán nárůst množství barviv během prvních pěti dnů. U vzorku kontrolního pozvolný nárůst barviv pokračoval do sedmého až desátého dne, kdy množství uvolněných antokyanů dosáhlo stejné hodnoty jako u vzorků rmutu upravených enzymovými preparáty (obr. 8.)



Obr. 8: Množství antokyaninových barviv ve vzorcích rmutu po pěti dnech nakvácení

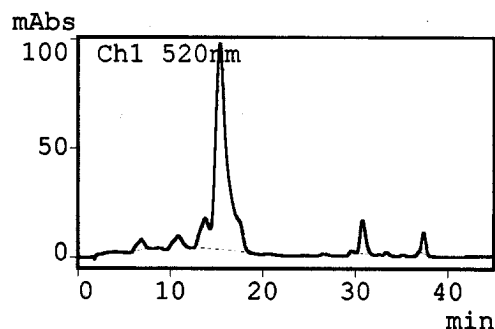
6.2.2 HPLC analýza vzorků rmutu

U vzorků rmutu po ukončení nakvácení byla provedena analýza pomocí HPLC. Na chromatografickém záznamu (obr. 9) jsou patrné hlavní píky malvidin-3-monoglukosidu (s retenčním časem 16 min), malvidin-3-monoglukosid -acetátu (31,5 min.) a malvidin-3-monogluko-sid-kumarátu (37,5 min).

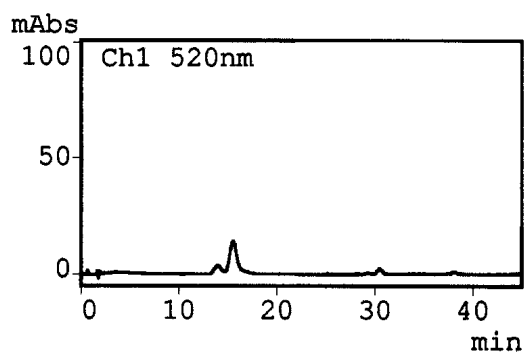
Je patrný značný rozdíl v množství uvolněných antokyanů do šťávy ihned po vylisování (obr. 10), ve rmutu po nakvácení s přidáním pektolytickými enzymy (obr. 9) a bez jejich přidání (obr. 11).

Nízké množství antokyanových pigmentů v kontrolním vzorku je možno zdůvodnit tím, že vlivem nedostatečného působení pektolytických enzymů došlo během prefermentace k méně intenzivnímu odštěpení barviv vázaných na pevné

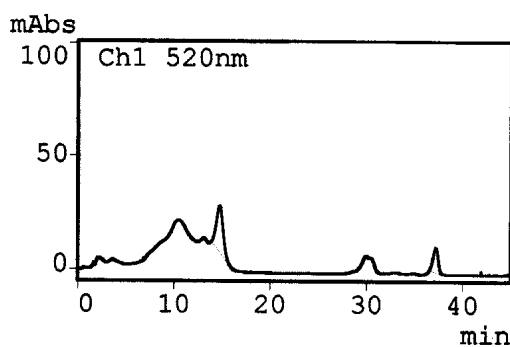
součástí buněčných stěn. Barviva zůstala vázána na látky, které před analýzou ulpěly na filtru.



Obr. 9: Chromatografický záznam vzorku rmutu upraveného pektolytickým preparátem po pěti dnech nakvácení.



Obr. 10: Chromatografický záznam vzorku šťávy z modrého hroznu.

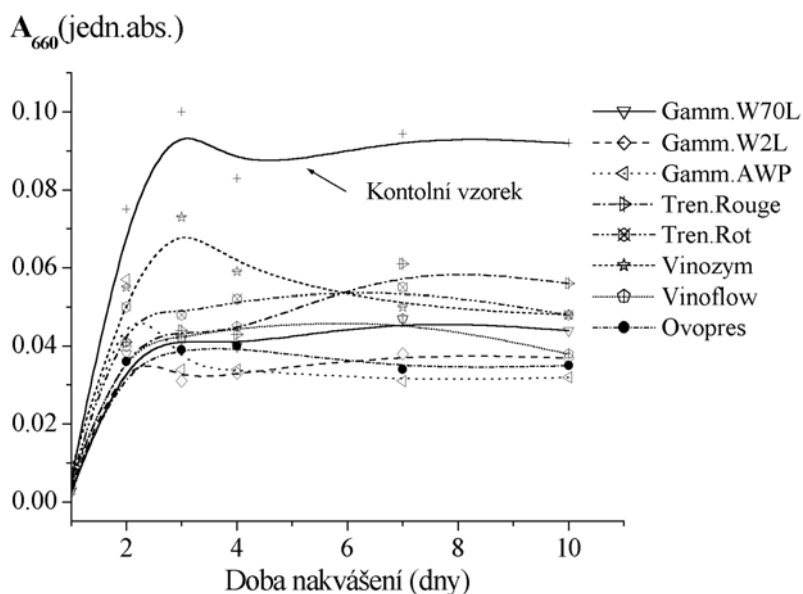


Obr. 11: Chromatografický záznam kontrolního vzorku rmutu po pěti dnech nakvácení.

6.2.3 Zákaly ve vzorcích rmutu

Absorbance při 520 nm (absorbční maximum antokyanů) může být zčásti ovlivněna množstvím zákalu. Relativní zastoupení látek tvořících zákal lze zjistit

spektrofotometricky, měřením absorbance při 660 nm, kdy antokyany již neabsorbují²⁸.



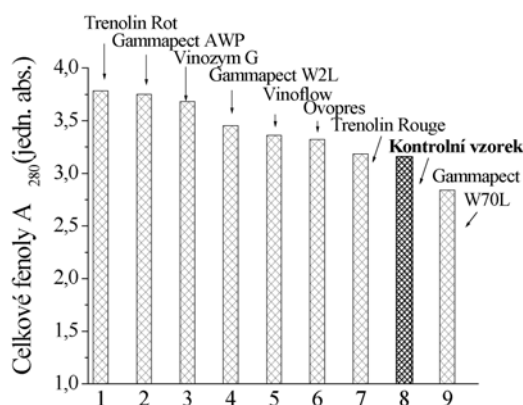
Obr. 12: Relativní množství zákalu ve vzorcích rmutu během nakvāšení.

V experimentech byl sledován zákal vzorků během prvních deseti dnů prefermentace. První 3 dny byl zaznamenán prudký nárůst zákalu u všech vzorků. Docházelo tedy vlivem činnosti révových enzymů k intenzivnímu rozrušování slupek bobulí vinné révy. Nejvyšší nárůst této hodnoty lze pozorovat u kontrolního vzorku. Zde nejsou přítomny aditivní enzymy, které by produkty počátečního štěpení rozložily a proto se vysoká hodnota dále během fermentace udržuje.

K vyššímu nárůstu množství zákalu oproti ostatním vzorkům dochází např. u vzorku po aplikaci preparátu Vinozym, aktivity jehož enzymů jsou relativně nízké. Oproti kontrolnímu vzorku v dalších dnech dochází ke snížení této hodnoty.

6.2.4 Uvolňování fenolických látek během nakvāšení rmutu

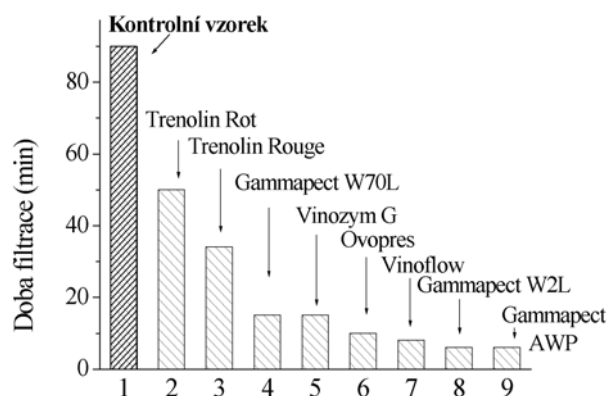
Fenolické látky jsou důležitou složkou červeného vína, neboť mají vliv na barvu, chuť a celkový charakter červených vín. Při aplikaci pektolytických preparátů je množství celkových fenolů vyšší než u vzorku kontrolního. Nejvyšší obsah byl stanoven u vzorků vín, u nichž bylo použito preparátů, Trenolin Rot, Gammapect AWP a Vinozym. U enzymového přípravku Gammapect AWP může být toto vysoké množství přisouzeno důkladnému štěpení pletiv vlivem vysoké CE aktivity a s tím spojené usnadněné extrakci sledovaných látek, u přípravků Trenolin Rot a Vinozym vysokému množství uvolněných antokyanových látek, které tvoří podstatnou část skupiny vinných fenolů.



Obr. 13. Množství fenolických látek uvolněných do rmutu během 5 dnů nakvácení.

6.2.5 Rychlost filtrace

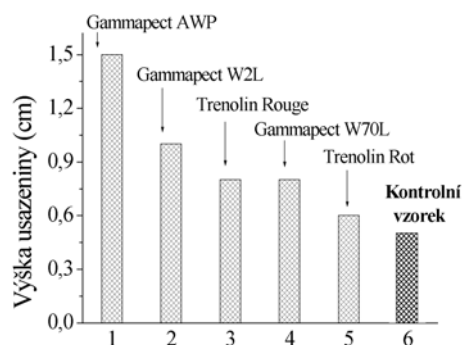
Rychlost pronikání kapaliny obsahující více či méně koloidních částic filtrem, může být jedním z ukazatelů účinnosti použitých pektolytických preparátů při nakvácení rmutu. Účinnost pektolytických preparátů jsme tímto způsobem porovnali na konci nakvácení. Nejvyšší rychlosti filtrace byly ve většině experimentů dosaženy při použití preparátů Gammapect AWP a Ovopres, u kterých byly později stanoveny velice vyrovnané hodnoty všech sledovaných enzymových aktivit. Tento jev byl sledován již během velice krátké doby prefermentace, kdy došlo k mnohonásobnému urychlení filtrace vzorků po aplikaci enzymů oproti vzorku kontrolnímu.



Obr. 14: Doba filtrace vzorků rmutu na konci nakvácení.

6.2.6 Sedimentace

Při podmínkách statického odkalování kaly v moštu klesají na dno nádoby, čímž se mošt čistí. Také zde se projeví účinek pektolytických enzymů. Ty, štěpením pektinu jako ochranného koloidu, urychlí proces koagulace a sedimentace zákalových částic. Následující graf ukazuje tloušťku vrstvy sedimentu ve víně, která se utvořila 10 minut po promíchání experimentálních lahví.



Obr. 15: Množství usazených látek ve víně.

Nejvíce sedimentu se během deseti minut vytvořilo v experimentální nádobě se vzorkem vína, při jehož přípravě byl použit enzymový preparát Gammapect AWP a dále Gammapect W2L. Tyto enzymové preparáty již v předchozích experimentech vykazovaly vysokou účinnost při štěpení pektinu.

6.2.7 Stanovení enzymových aktivit pektolytických preparátů

U pektolytických přípravků, které jsou určeny k výrobě vína, a které byly použity v tomto experimentu, byly stanoveny následující enzymové aktivity^{37, 38}.

Nejvyšší **pektinesterázovou** aktivitu vykazovaly přípravky Gammapect W2L a Gammapect W70L. Nejvyšší **polygalakturonázová** aktivita byla stanovena u preparátů Gammapect W2L a Trenolin Rouge. Nejvyšší **pektinlyázová** aktivita byla stanovena u přípravků Trenolin Rot a Ovopres. Vybrané komerční preparáty byly dále testovány na **celulolytickou** aktivitu. Nejvyšší aktivitu vykazovaly přípravky Vinoflow a Ovopres. Nalezené hodnoty aktivit preparátů použitých v tomto experimentu jsou uvedeny v tabulce 3.

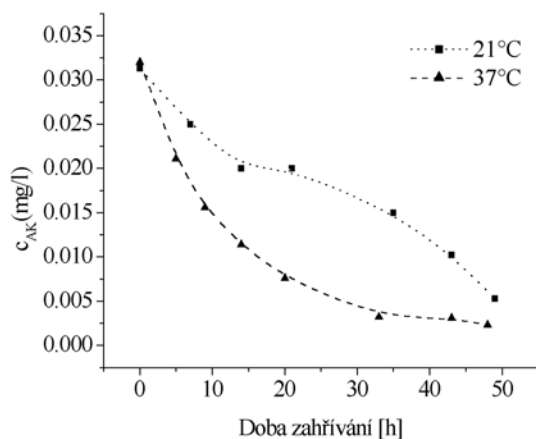
Enzymové přípravky	Vinoflow	Vinozym G	Gamma-pect W2L	Trenolin Rouge	Trenolin Rot	Ovopres	Gamma-pect W70L
PMs $V_{\text{NaOH}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	0,24	0,29	3,95	- ^{ns}	0,55	2,9 8	3,15
PG $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	4,30	4,10	12,80	11,30	7,10	6,70	5,40
PL $A_{235} \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	0,58	- ^{ns}	0,83	0,76	0,29
CE $\mu\text{mol} \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	310	222	97	- ^{ns}	176	250	101

-^{ns}...nestanoveno

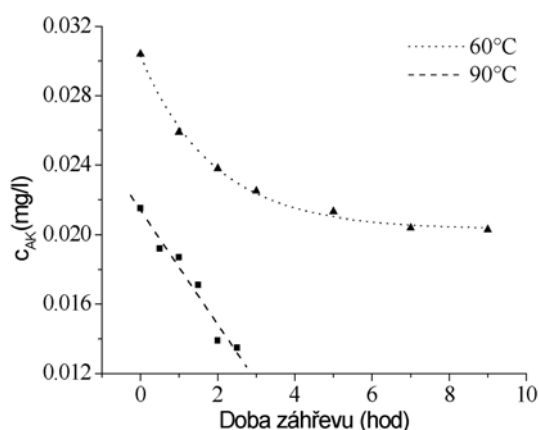
Tab. 3: Hodnoty enzymových aktivit použitých pektolytických preparátů

6.2.8 Degradace antokyanových barviv

Stabilita antokyanů byla sledována především proto, aby mohlo být zjištěno, zda u vína, které bylo vyrobeno technologií nakvácení s pektolytickými enzymy, dochází ke změnám ve stabilitě barviv. Degradace antokyanů vína byla sledována v přítomnosti světla při teplotách **21, 37, 60 a 90 °C**.



Obr.16: Degradace antokyanů vzorku vína při teplotách 21 a 37°C



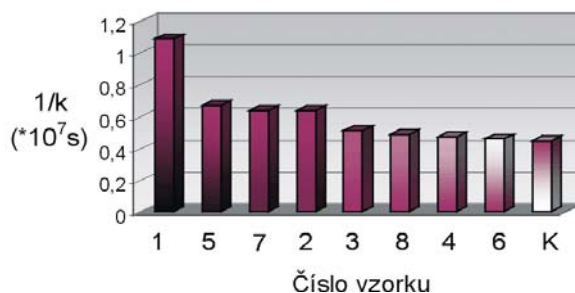
Obr. 17: Degradace antokyanů vzorku vína při teplotách 60 a 90°C.

Směrnice závislosti $\log c_{AK} / c_{AK0} = f(T)$ při dané teplotě vypočítaná metodou nejmenších čtverců pro danou regresní přímku udává rychlostní konstantu rozkladu barviva **k**.

S přihlédnutím k regresním koeficientům byly ze závislosti $\log c_{AK}/c_{AK0} = f(T)$ (1.řád) nebo $1/c_{AK} = f(T)$ (0. řád), kde T je doba ohřevu, vypočítány metodou lineární regrese rychlostní konstanty degradace antokyanů jednotlivých vzorků.

Při teplotě **21°C** bylo při sledování stability barviv po dobu 50 dnů zjištěno, že antokyaniny degradovaly nejrychleji u kontrolního vzorku (obr.18). Vzorky

pro jednotlivé teploty byly seřazeny sestupně dle klesající stability, která byla vyjádřena inverzní hodnotou konstanty degradace **k**.

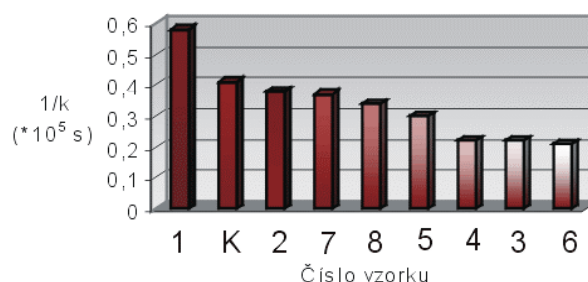


Obr. 18. Stabilita antokyanů u vzorků vín při 21 °C.

(1-Gamapect W70 L, 2-Gammapect W2 L, 3- Gammapect AWP, 4-Trenolin Rouge, 5-Trenolin Rot, 6-Vinozym, 7-Vinoflow, 8-Ovopres, K-kontrolní vzorek).

Nejpomaleji probíhala degradace barviv při 21 °C u vzorků, při jejichž nakvácení byly použity preparáty. Gamapect W70 L a Trenolin Rot.

Sledováním degradace antokyanů při 90 °C jsme byl zjištěn spíše negativní vliv použití pektolytických preparátů při nakvácení rmutu, neboť u těchto vzorků degradovala barviva vždy rychleji, než u vzorku kontrolního (obr. 19).



Obr. č. 19.: Stabilita antokyanů vzorků vín při 90 °C.

(1-Gamapect W70 L, 2-Gammapect W2 L, 3- Gammapect AWP, 4-Trenolin Rouge, 5-Trenolin Rot, 6-Vinozym, 7-Vinoflow, 8-Ovopres, K-kontrolní vzorek).

S rostoucí skladovací teplotou červená barva mladého vína klesá díky snižující se koncentraci flaviliových kationtů a vzrůstá barva žlutá díky rostoucí koncentraci chalkonů^{16, 17, 13, 14, 18}. Zároveň klesá koncentrace relativně stabilních antokyan-kopigmentačních komplexů, po jejichž disociaci antokyanu projdou hydratací a tautomerizací, čímž dojde k poklesu červené a nárůstu žluté barvy vína. Množství polymerních barevných komplexů, tedy produktů antokyanových molekulárních interakcí závisí na množství antokyanů a dalších fenolických látek, které tyto komplexy s antokyanu tvoří.

U vzorků vín, při jejichž přípravě byly do rmutu aplikovány pektolytické enzymy, byl zjištěn vyšší obsah celkových fenolů. Lze tedy předpokládat, že při zrání těchto vzorků vín vzniklo i více polyfenolických barevných komplexů, které jsou

stabilnější než monomerní barviva, a které tudíž přispěly při nižší teplotě k vyšší stálosti barvy vína.

Při vyšších teplotách se projevuje přítomnost produktů Maillardovy reakce (furfuraly, reduktony aj.), které s antokyany poskytují hnědě zbarvené kondenzační produkty. Ve vzorcích vín, při jejichž výrobě bylo použito pektolytických preparátů, bylo stanoveno vyšší množství sacharidů, než u vzorků kontrolních, což může být důvod negativního ovlivnění stability barviv při vysoké teplotě použitím enzymových preparátů.

6.2.9 Porovnání enzymových preparátů

Enzymový preparát	Sledovaná charakteristika					
	Zvýšení extrakce barviv	Nárůst celkových fenolů	Snížení zákalu	Zvýšení rychlosti filtrace	Zvýšení rychlosti sedimentace	Zvýšení stability barvy
Gam. AWP	++	++	++	++	++	+
Vinozym G	++	++	+	+	ns	-
Trenolin Rot	++	++	-	+	-	++
Ovopres	+	+	++	++	ns	+
Gam.W2L	+	+	+	+	+	++
Vinoflow	+	+	+	+	ns	++
Tren. Rouge	++	+	+	+	+	-
Gam. W70L	-	+	+	+	+	++

Tab. 4. Porovnání enzymových preparátů

++.....výrazné zvýšení

+.....mírné zvýšení

-.....neliší se od kontrolního vzorku

ns....nestanoveno

7 ZÁVĚR

Mnoho parametrů vína, jako je množství antokyanů a celkových fenolů, rychlost filtrace, turbidita, je ovlivněno přítomností enzymů přirozeně se vyskytujících ve vinné révě. Ačkoli absolutní hodnoty těchto parametrů závisí na kultivaru, ročníku, klimatických podmínkách apod., při přípravě moštu lze použitím vhodných aditivních enzymů tyto parametry významným způsobem ovlivnit.

Problematika disertační práce byla řešena s cílem porovnat komerční preparáty pektolytických enzymů a následně doporučit k jejich efektivnímu využití. Na našem trhu se v současné době nachází velké množství enzymových přípravků určených k použití při výrobě vína, přičemž jsou tyto v poslední době malovýrobci i velkými vinařskými společnostmi často žádány.

Byla vybrána vhodná kritéria pro charakterizaci a porovnání účinnosti pektolytických preparátů. Enzymové preparáty byly podrobeny laboratorním zkouškám a za použití doporučených metod byly stanoveny enzymové aktivity uplatňující se ve významných technologických procesech.

Aplikace těchto preparátů byla začleněna do technologie výroby červeného vína ve vinařském provozu, byly provedeny mnohé laboratorní experimenty, čímž mohl být ověřen předpokládaný účinek enzymových preparátů v jednotlivých technologických krocích, v závislosti na jejich enzymovém složení. Předpokládaná spojitost výsledků byla realizovanými experimenty potvrzena.

Výsledky práce by tedy mohly být oporou při přípravě nových preparátů, ať specifických v účinnosti v určitých výrobních fázích, či při výrobě preparátů univerzálně použitelných. Při přípravě enzymových preparátů musí být dodrženo nezbytné enzymové spektrum, požadované enzymy by měly být ve svých aktivitách vyváženy, aby nedocházelo k jejich vzájemné limitaci působení a nebyla tak omezena celková účinnost enzymového preparátu.

8 LITERATURA

1. Timberlake, C. F.: Flavilium Salts, Anthocyanidins and Anthocyanins, *J. Sci. Food Agric.*, Vol.18, October, 1967.
2. Mazza, G.: Anthocyanins in Grapes and Grape products, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34 (4), 341-371 (1995).
3. Timberlake, C. F.: Anthocyanins: Occurrence, Extraction and Chemistry, *Food Chemistry* 5, 69-80, 1980.
4. Velíšek, J. : Chemie potravin, OSSIS Pelhřimov 1999
5. Mariásová, M. : Štúdium farbív Bazy chabzdovej, Kandidátska dizertačná práca. Bratislava 1991.
6. Katsaboxakis, K.: Stability of pigment orange anthocyanins in model and real food systems, *Ital.J.Food Sci.*, n. 1, vol. 10, 1998.
7. Ros Barcelo, A., Calderon A.A., Zapata J.M., Munzor R.: The biochemical localization of anthocyanins in seed and seedless grapes (*Vitis vinifera*). *Scientia Horticulturae*, 57, 265-268 (1994).
8. Somers, T.C., Evans M.E., Cellier K.M.: Red wine quality and style: Diversities of composition and adverse influences from free SO₂. *Vitis*, 22, 348-356 (1983).
9. Kraus, V.: Rukověť vinaře, Nakl.KVĚT, Praha 2000Ch.
10. Markov, P.: O víně, Lidové nakladatelství Praha, 1985.
11. Švejcar, V.: Vinařství – základy technologie, skripta FZ VŠZ, 1. Vydání, VŠZ Brno, 1986.
12. Čepička, J. a kolektiv: Technologie výroby vín, skripta VŠCHT, 1. Vydání, VŠCHT Praha, 1995.
13. Dallas, C.: Degradation of oligomeric procyanidins and anthocyanins in Tanta Roriz red wine during maturation, *Vitis* 34 (1), 51-56, 1995.
14. Flora, L. F.: Storage stability of Juices and Jellies made from Muscardine Grapes, *Am. J. Enol. Viticult.* Vol. 28, No. 3, pp. 171-175, 1977.
15. Angella, C.: Blending Wines to Color, *Am. J. Enol. Viticult*, Vol.25, No 2, 1974.
16. Liao, H.: Polyphenol Interactions, *J. Sci. Food. Agric.*, 59, 299-305, 1992.
17. Timberlake, C. F.: The effect of processing and other factors on the colour characteristics of some red wines, *Vitis* 15, 37-49 (1976).
18. Berg, H, W.: On the nature of reactions responsible for colour behavior in red wine, *Am. J. Enol. Viticult.*, Vol 26, No 3, 1975.
19. Somers, T.C., Evans M.E.: Grape pigment Phenomena: Interpretation of Major Color Losses during Vinification., *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30, 623-633 (1979).
20. Gustafsson I. B.: Wine and coronary disease, *Scandinavian Journal of Nutrition*, 41, No. 2. p. 58-61, 1997.
21. Lehmann, H.: Číření ovocných šťáv, SNTL-nakladatelství tech, lit Praha, 1990.
22. Whitaker, J. R.: Pectin substances, pectin enzymes and haze formation in fruit juices. *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 6, August 1984.

23. Alkorta, I., Garbisu C.: Industrial Applications of Pectic Enzymes: a review. *Process Biochemistry*, vol. 33, No. 1, 21-28, 1998.
24. Pektolytische Enzym-präparate im Vergleich, *Weinwirtschaft Technik*, No.6, 30. Juni (1989).
25. Rexová-Benková, L. and Markovic,O., *Pectic enzymes*, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 33, p. 323-385, 1976.
26. Gainvors, A., Frézier, V.: Detection of Polygalacturonase, Pectin-lyase and Pectin-esterase Activities in a *Sacchromyces cerevisiae* Strain. *Yeast*, vol. 10, 1994, 1311-1319.
27. Ough, C. S., Noble, A. C.: Pectic enzyme effect on red grape. *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 26, No. 4, 1975, 195-200.
28. Capdeboscq, V., Leske P.: An evaluation of some winemaking characteristics of commercial pectic enzyme preparations, *The Australian Grapegrower & Winemaker*, 146-150.
29. Dugelay, I., Gunata, Z.: Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. *J. Agric. Food. Chem.*, 1993, 41, 2092-2096.
30. Gunata, Z., Bayonove, C. L.: Extrraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some graape aroma components. *Journal of chromatography*, 331, 1985, 83-90.
31. Shinohara, T., Saito, K.: Selection and hybridization of wine yeasts for improved winemaking properties: Fermentation rate and aroma productivity. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. Vol. 77, No. 4, 428-431, 1994.
32. Sommers, T. C., Evans, M. E.: Spectral evaluation of Young red wines, *J. Sci. Food. Agric*, 28, 279-287, 1977.
33. Timberlake, C. F.: Correlation between quality and pigment parameters in young Beaujolais red wines, *Ann.Nutr. Alim.*, Vol. 32, No. 5, 1978.
34. Gao, Y.: HPLC analysis of Anthocyanins in the Red Seedless Table Grape Reliance, *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 46, No. 3, 1995.
35. Drdák, M., Daučík, P.: Method of separation of anthocyanins in red wines by HPLC, *Die Nahrung*, 36, 4, 411-413, 1992.
36. Gao L.: Rapid method for complete chemical characterization of simple and acylated anthocyanins by HPLC and GLC, *J. Agric. Food Chem.*, 42, 118-125, 1994.
37. Indruch, P.: Charakterizace a porovnání komerčních pektolytických preparátů. Diplomová práce, FCh VUT Brno, 2000
38. Kovářová, L.: Charakterizace a porovnání komerčních pektolytických preparátů, Diplomová práce, FCh VUT Brno, 2001.
39. Škvařilová, D.: Stanovení přírodních barviv, Diplomová práce, FCH VUT, Brno 1998

9 PŘÍLOHA

SEZNAM ZKRATEK:

PE	pektinesteráza
PG	polygalakturonáza
PL	pektinlyáza
CE	celulóza
Ara	α -L-arabinofuranosidáza
β D	β -D-glukosidáza
d. p.	stupeň polymerizace
d. e.	stupeň esterifikace
ASVK	aktivní sušené vinné kvasinky
CHD	srdečně -cévní choroby
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HM pektin	vysokoesterifikovaný pektin
LM pektin	nízkoesterifikovaný pektin
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě

10 ŽIVOTOPIS

Vzdělání:

Gymnázium T. G. Masaryka, Zastávka u Brna:1989 – 1993, studium ukončeno maturitní zkouškou.

Chemická fakulta VUT Brno :1993 – 1998, Ústav biotechnologie a chemie potravin, studium ukončeno státní zkouškou s výborným prospěchem.

Postgraduální studium 1998 – 2002, FCH VUT Brno, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí.

Zaměstnání:

Ústřední inspektorát České zemědělské a potravinářské inspekce Brno, nástup Duben 2002

Pracovní zařazení: Referent chemických laboratoří

Jazykové znalosti:

Anglický jazyk: Pokročilá slovem i písmem

Německý jazyk: Maturitní zkouška

Francouzský jazyk: Začátečník

Další aktivity:

- Konzultace diplomových prací studentů 5. ročníků na FCH VUT Brno, ústavu Biotechnologií a chemie potravin.
- Pedagogická praxe v oblastech: biotechnologie, analýzy potravin, fyzikální chemie, biochemie, mikrobiologie.
- Aktivní účast na domácích a mezinárodních konferencích.

Absolvovaná školení a získaná osvědčení:

- Odborné semináře: Chromatografické separační metody
- Osvědčení vydané Úřadem vlády České republiky o úspěšném absolvování Univerzálního vzdělávacího bloku
- Osvědčení vydané ASP, a. s. a Ústavem státu a práva Akademie věd České republiky o absolvování distančního kurzu k problematice Evropské unie

11 SEZNAM AKTIVIT A PUBLIKACÍ

1. Škvařilová D: Stanovení přírodních barviv, Diplomová práce, FCH VUT Brno, 1998
2. Škvařilová D., Drdák M: Chemical characteristics of red wines, *Transfer* 99, 7. 6. – 8. 6. 1999, sborník ISBN: 80-214-1341-7, s.21.
3. Škvařilová D., Drdák M.: Enzyme aplikation in the wine production, *Chemistry and Life*, 9. 9. –10. 9. 1999, sborník ISBN: 80-214-1371-9, s.152.
4. Škvařilová D.: Pectic enzymes and their application in winemaking process, Písemné pojednání k disertační práci, FCH VUT Brno, květen 2000.
5. Škvařilová D.: Využití pektolytických enzymů pro zvýšení kvality červeného vína, XXXII. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, Skalský Dvůr, 22. -24. 5. 2000.
6. Škvařilová D., Drdák M.: Chemical Changes of Pigments in the Red Wine, *Reactions in Foods*, 20-22 září, Praha 2000, sborník: *Czech J. Food Sci.*, Vol. 18, 218 – 219, 2000.
7. Škvařilová D.: Využití pektolytických enzymů při výrobě červeného vína, XXXII. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, Skalský Dvůr, 28. -30. 5. 2001.
8. Omelková J., Indruch P., Škvařilová D.: Porovnávací studie vlastností vybraných komerčních pektolytických preparátů, XXXII. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, 28. -30. 5. 2001, Skalský Dvůr.
9. Škvařilová D., Indruch P.: Use of Pectic Enzymes in Winemaking Process, 3rd International Conference of PHD Students, University of Miskolc, Hungary, 13. -19. 8. 2001
10. Škvařilová D: Use of pectic enzymes in winemaking process, Soutěž studentské tvůrčí činnosti, Student FCH 2001, Sborník příspěvků: ISBN: 80-214-1932-6, 209-213.
11. Škvařilová D.: Využití pektolytických enzymů při výrobě červeného vína, *Vinařský obzor*, 364 – 365, 9, 2001.
12. Škvařilová D.: Obsah sensoricky aktivních látek ve víně po aplikaci enzymových přípravků, *Vinařský obzor*, 364 – 365, 4, 2002.
13. Škvařilová – Čapounová D., Drdák M.: Comparison of some commercial pectic enzyme preparations applicable in wine technology, *Czech J. Food Sci.*, Vol. 20, No. 4:131-134, 2002.

ABSTRACT

The preparations are used for better extraction of desirable red grape pigments and other phenol compounds, which are bonded in plant cells and can be faster released by action of pectic enzymes. Moreover, they shorten the time of maceration, settling and filtration. The enzyme preparation in current commercial can contain diverse amounts of cellulytic, β -glykosidic, proteolytic and other species of enzymes apart from the main pectic enzymes that split pectic compounds. For the production of these enzymes mainly fungi line of *Aspergillum* is used.

Pectins are present in tissues of all higher plants and differ in composition. The plant tissues are formed by cells, which are separated by wall cells, contrary to the animal cells. Pectin is present as intercellular putty, and together with hemicellulose forms a part of wall. The pectin belongs to group of polysaccharides. To the main polysaccharide chains other shorter or longer, smooth or branched, saccharide chains are bonded. The pectic enzymes are able to split those chains and saccharidic bonds between chains.

The pectic enzyme preparations were added to unclarified juice that was obtained from harvested Blaufränkisch red grapes. The red grapes were crushed; the mash was placed in the prefermentation reservoirs. Corresponding quantities of enzyme preparations were added. All samples were clarified by filtration and centrifugation before the measurement.

The determination of anthocyanins is based on the evaluation of absorbency A_{520} . The value of this absorbency corresponds to the released amount of red grape pigments. Trenolin Rot and Vinozym G were found to be the best of all preparations followed.

The densest cloud was found in the control sample, and on the other hand, in the case the application of Gammapect AWP and Ovopres preparations, the concentration of the cloudy stuffs was very low.

The shortest times of filtration (as short as 1/10 of that of the control) were found in the cases of the following preparations: Gammapect AWP and Gammapect W2L. The experiments were carried out at the end of pre-fermentation.

The process of coagulation and settling of cloudy stuffs was accelerated. The speed of desliming was in the case of Gammapect AWP and Gammapect W2L three times and two times faster, respectively, compared to the control sample.

Maximum release of red grape pigments took place within 4 or 5 days after application of pectic enzyme preparations during pre-fermentation of mash from red grape Blaufränkisch. Except control sample, we didn't observe any further increase in red colour, but we found dissolution of red pigments and decrease of wine colour. In the control sample without the application of the preparations, 7 days were necessary to achieve the same effect, i. e. 2-3 days more than in samples with enzymes. Trenolin Rot, Vinozym G and Gammapect W2L increased most the intensity of wine colour during 4 or 5 day of prefermentation.

The shortest time of filtration was found after the application of the preparations Gammapect AWP (as short as 1/10) and Ovopres. The speed of desliming was three times higher after the use of pectic enzymes.

Partial activities of pectic enzyme preparations were determined either. Correlation between composition of preparations and their action in partial steps of winemaking process was found. Optimum composition of preparations could be found on base of our results with enzymes in the right ratio, which enables proper activity in lower concentration.

Above all our results are important for big winery plants, because the use of enzyme preparations that shortens some technological steps, and they can process large amount of harvested grape. It can produce wine with higher sensory quality in shorter time by more economic way.