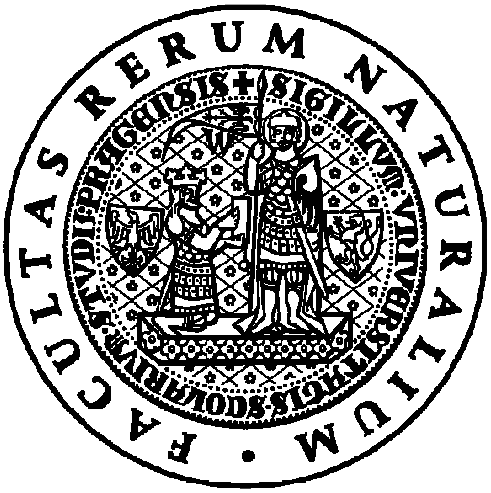
Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



Tereza Vacková

Biochemické parametry vína a jejich změny během stárnutí

The biochemical parameters of wine and their changes during ageing

Bakalářská práce

Vedoucí práce: **prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc**.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 3.6. 2011

Podpis

Poděkování

Děkuji panu Prof. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc. za vedení práce, za odborné náměty, rady a připomínky.

Dále děkuji kolegům z laboratoře: RNDr. Michaele Moserové, Mgr. Tomáši Ječmenovi, Bc. Monice Koberové a Bc. Janu Milichovskému za pomoc se senzorickým hodnocením a kolegům Mgr. Ondřeji Zítkovi, Ing. Jiřímu Sochorovi, PhD. a Sylvii Skaličkové z laboratoře doc. Ing. Reného Kizka, PhD. z Agronomické fakulty Mendelovy zemědělské univerzity v Brně za stanovení antioxidační aktivity.

Obsah

1. Seznam použitých zkratek……....6
2. Abstrakt…….....7
3. Abstract……8
4. Přehled literatury……...9
4.1. Morfologie a chemické složení hroznů……9
4.1.1. Složení slupky……9
4.1.2. Složení dužiny……..12
4.1.3. Složení semen……...12
4.1.4. Složení třapin……13
4.2. Biochemické změny při růstu a zrání hroznů…….13
4.2.1. Fáze růstu hroznů…….13
4.2.2. Fáze dozrávání…….13
4.2.3. Fáze přezrávání……15
4.2.4. Sacharidy……..16
4.3. Zpracování hroznů na mošt a jeho složení…….19
4.3.1. Výroba moštu……...19
4.3.2. Chemické složení moštu……...19
4.4. Výroba vína……21
4.4.1. Výroba bílého vína……...21
4.4.2. Výroba červeného vína…….22
4.4.3. Základní biochemické procesy při výrobě vína a při jeho skladování (oxidace)……22
4.4.3.1. Anaerobní fermentace…….22
4.4.3.2. Jablečno-mléčná fermentace……...23
4.4.3.3. Aerobní fermentace…….23
4.4.3.4. Mléčné kvašení……24
4.4.3.5. Rozklad kyseliny vinné……...24
4.4.3.6. Oxidace vína a změna barvy……25
5. Cíle práce……28
6. Experimentální část…….29
6.1. Chemikálie a roztoky…….29
6.2. Přístroje……..30

6.3. Metody……...31
6.3.1. Metody stanovení parametrů ve víně podle soupravy Malá vinařská laboratoř……..31
6.3.2. Spektrofotometrické metody……33
6.3.3. Konduktometrie……33
6.3.4. Orientační stanovení hustoty využitím hustoměru a pyknometru…34
6.3.5. Měření titrační křivky……...33
6.4. Chemikálie, přístroje a metody analýz prováděné na MZU v Brně…...34
6.4.1. Chemikálie a roztoky……...34
6.4.2. Přístroje……34
6.4.3. Metody……34
7. Výsledky……37
7.1. Bílá vína……37
7.1.2. Senzorické hodnocení vína A a B……37
7.1.2. Změřené parametry vína A……...38
7.1.3 Změřené parametry vína B……...39
7.1.4. Fyzikálně-chemické parametry vín A a B……39
7.2. Červené víno……..40
7.2.1. Senzorické hodnocení vína C……...40
7.2.2. Změřené parametry vína C……...41
7.2.3. Fyzikálně-chemické parametry vína C……41
7.3. Spektra…….....42
7.3.1. Porovnání spekter vín A a B……42
7.3.2. Spektra vína C……..43
7.3.3. Porovnání titračních křivek……..44
7.4. Další stanovení prováděné na MZU v Brně……..46
8. Diskuse……47
8.1. Bílá vína……47
8.2. Červené víno……..50
8.3. Porovnání bílého a červeného vína……50
8.4. Antioxidační aktivita (měřeno na MZU v Brně)……51
9. Závěr……...53
10. Seznam použité literatury……54

1. Seznam použitých zkratek

ABTS	2,2′-azinobis(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonát
AGPasa	*ADP-Glucose pyrophosphorylase* – ADP-glukosapyrofosforylasa
cFBPasa	*cytosolic fruktose-1,6-bisphosphatase* – cytosolová fruktosa-1,6-bisfosfatasa
DMSO	dimethylsulfoxid
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
FRAP	*Ferric reducing antioxidant power*
PVPP	polyvinylpolypyrolidon
SPP	*sucrose-phosphate phosphatase* – sacharosafosfátfosfatasa
SPS	*sucrose-phosphate synthase* – sacharosafosfátsynthasa
TEAC	*Trolox Equivalent Antioxidant kapacity*
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-s-triazin
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2 karboxylová kyselina
UGPasa	*UDP-Glucose pyrophosphorylase* – UDP-glukosa pyrofosforylasa

2. Abstrakt

Jednotlivé odrůdy bílých i červených vín se liší různým chemickým složením. Stejné značky vína stejného ročníku se mezi sebou mohou lišit i visuálně, například barvou. Tyto rozdíly mohou být dány také odlišným zastoupením jednotlivých složek ve víně, přitom i "stejná" vína, ale mohou být ve skutečnosti poněkud odlišné směsi vín různých odrůd.

Použitím sady činidel (Malá vinařská laboratoř, Vinařské závody Velké Bílovice) a dalšími metodami byly stanoveny základní parametry ve dvou vzorcích bílého vína shodně označeného, ale s odlišným vzhledem a z jiných šarží. Pro srovnání byl stejně zkoumán i jeden vzorek červeného vína. Byly sledovány změny těchto charakteristik během stárnutí vína, tedy od otevření lahve po dobu čtrnácti dnů (při uložení v chladu) a při krátkodobém vystavení vyšší teplotě.

Naše laboratorní výsledky byly doplněny ještě podrobnějšími údaji o zastoupení jednotlivých antioxidantů a fenolických látek, získanými na specializovaném pracovišti Mendelovy zemědělské univerzity v Brně.

Klíčová slova: alkoholové kvašení, chemické složení hroznů**,** jablečno-mléčná fermentace, oxidace, stárnutí vína,

3. Abstract

Wines marketed under the same brandname and designation may differ in color and other characteristic, as they may come from different batches. These differences may reflect different concentrations of individual components in wine, reflecting, for example, different compositions of individual cupages.

We used the reagent set "Malá vinařská laboratoř" (supplied by the BS Vinařské závody, Velké Bílovice, ČR) to determine principal parameters of two samples of a white wine with the same brandname, differing in color. For comparison, one sample of red wine was studied with the same methods. After opening the wine, we followed the changes of selected parameters during ageing, for 14 days (keeping the wine in a cold place), and also in a short-term experiment under elevated temperature.

Our laboratory data were complemented by a more detailed analysis of phenolics and other antioxidants, performed in a specialised laboratory (Mendel Agricultural University, Brno, ČR).

Key words: fermentation, chemical content of grapes, malo-lactic fermentation, oxidation, wine ageing

4. PŘEHLED LITERATURY

Víno je známo již od pradávna. Již 6000 let před naším letopočtem byla vinná réva pěstována v Iránu, Afghánistánu a v Číně. Odtud se její další pěstování rozšířilo do dalších částí světa. Více než 3 500 let před naším letopočtem tedy bylo víno známo i v Asýrii, Babylónii a Egyptě, kde pěstovali dokonce osm odrůd. Stále intenzivnější mezinárodní kontakty způsobily, že se víno dostalo i dále na západ a to až do Itálie, na Sicílii, do Španělska, Řecka a na Krétu. Z těchto oblastí bylo dále rozšířeno také do Afriky, Francie a nakonec i k nám do Střední Evropy. Až do dnešní doby je víno oblíbeným nápojem při slavnostních příležitostech.

Pití vína – v mírném množství – má pozitivní vliv na zdraví člověka. Obsahuje antioxidantní látky, snižuje onemocnění cév, obsahuje také řadu vitamínů a minerálů jako například hořčík a vápník. Jeho pozitivním účinkům se připisuje tzv. francouzský paradox. Víno má všeobecně baktericidní a antiseptické účinky.

Je mnoho faktorů, které mají vliv na kvalitu budoucího vína, na obsah jeho složek. Nejdůležitější je kvalita půdy a její obsah živin a minerálních látek v ní, dále jsou to i klimatické podmínky.

Na senzorickou kvalitu vína má velký vliv také jeho stárnutí a způsob jeho skladování. Biochemickým změnám, k nimž přitom ve víně dochází, je věnována tato bakalářská práce.

4.1. Morfologie a chemické složení hroznů

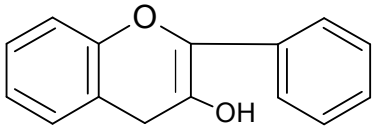
Hrozny se skládají z bobulí a třapin. Jednotlivé bobule obsahují slupku, dužinu a semena.

4.1.1. Složení slupky

Slupka tvoří 9–11 % hmotnosti hroznů a je kryta voskem, který chrání bobuli před nežádoucími mikroorganismy a zabraňuje také velkým ztrátám vody. Nejvíce zastoupenou sloučeninou ve slupce je voda, která představuje 60–80 % hmotnosti. Voda má důležitou roli hlavně během růstu hroznů a v chemických reakcí (fermentaci). Sloučeniny, které vznikají během růstu révy i během fermentace se liší svou rozpustností ve vodě, a to ovlivňuje charakter vína. Hlavní (strukturální) složkou slupky je celulosa, která patří mezi polysacharidy (jde o lineární

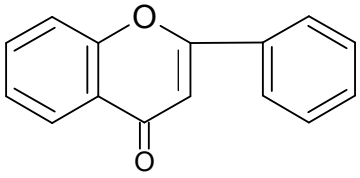
polyglukan). Z hlediska ovlivnění vlastností vína mají velký význam třísloviny, aromatické látky, kyseliny, barviva, dusíkaté a minerální látky. Všechny tyto látky ovlivňují charakter výsledného produktu [1], [2], [3].

Nejdůležitější látky, které jsou ve slupce obsaženy, jsou třísloviny a barviva. Třísloviny jsou fenolické látky (jejich množství se pohybuje mezi 0,4-2,5 %), které dodávají vínu typickou trpkou chuť, která je velice žádoucí hlavně u červených vín. Nejvíce zastoupenou látkou, ze skupiny tříslovin, je tanin, který se ve víně objevuje také v podobě kondensovaných taninů. Z chemického hlediska jde o polymery, jejichž základní monomerní jednotkou jsou flavan-3-oly, neboli katechiny (obr. 1). Vyskytují se nejčastěji ve formě dimerů a trimerů. Jejich oxidací dochází ke vzniku hnědě zabarvených polymerů [4], [5].



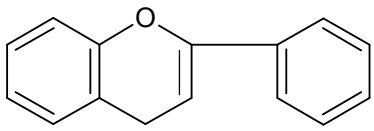
Obr. 1 : Flavan-3-ol (katechin) [5]

Pro jednotlivé odrůdy révy je charakteristické různé zastoupení barviv. Bílé odrůdy obsahují žlutozelené pigmenty, tzv. flavony (anthoxanthiny) (obr. 2).



Obr. 2 : Flavon [5]

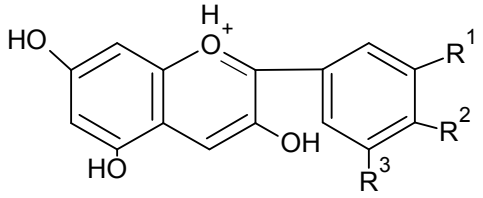
Z chemického hlediska se jedná o barevné deriváty flavonoidů, jejichž základní stavební jednotkou je flavanový skelet (obr. 3) [5].



Obr. 3 : Flavanový skelet [5]

Kromě flavonoidních látek jsou v bílých vínech obsaženy neflavonoidní sloučeniny a to zejména deriváty kyseliny hydroxybenzoové a hydroxyskořicové. Tyto sloučeniny se dostávají do vína z rmutu, tedy z rozemletých bobulí [4], [6], [7].

Červené a modré odrůdy obsahují červená barviva, tzv. anthokyaniny. Ty se skládají z anthokyanidinů, které jsou zodpovědné za barvu, a z cukerné části (obr. 4).

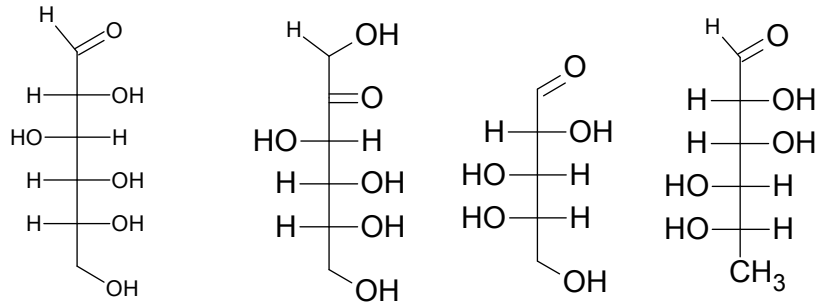


Obr. 4 : Anthokyanidin [35]

Z chemického hlediska se jedná o deriváty flavonoidů, které jsou *O*-glykosidicky vázány se sacharidy, jedná se tedy o glykosidy. Cukernou složkou může být glukosa, galaktosa, rhamnosa či arabinosa (obr. 5). Antokyaniny mají amfoterní charakter a jejich strukturu ovlivňuje hodnota pH. V protonizované formě (jako kationty) jsou zodpovědné za červené zabarvení vína, ale dojde-li k deprotonizaci, zbarvení se mění [4], [5], [6], [7].

Podle různých substituentů na kruhu (R^1, R^2, R^3) můžeme antokyaniny dále dělit na malvidin, cyanidin, delfinidin, petunidin a peonidin [8].

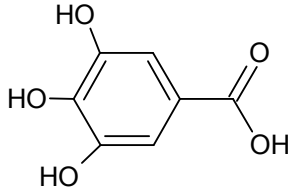
Ke snížení množství celkových antokyaninů v hroznech dochází při teplotách kolem 35^{o}C [9].



Obr. 5 : Nejčastější cukerné složky antokyaninů

Jak již bylo řečeno, antokyaniny, flavony a flavan-3-oly se vyskytují ve slupce hroznů, další fenolické látky, které se po zpracování hroznů vyskytují v moštu a víně, jsou hydrolyzovatelné taniny, které se do vína dostaly z dubového sudu.

Z chemického hlediska jsou to estery glukosy nebo vícesytných alkoholů s aromatickými kyselinami, jako jsou kyseliny gallová (obr. 6) a ellagová [4], [6], [7].



Obr. 6 : Kyselina gallová [5]

4.1.2. Složení dužiny

Dužina tvoří 78-90 % hmotnosti hroznů. Jsou v ní obsaženy cévní svazky, které celou bobuli vyživují a zabírají přibližně 8 % hmotnosti dužiny. Zbytek hmotnosti bobule tvoří mošt, který je tvořen především vodným roztokem sacharidů [1], [10]. Podrobněji bude o složení moštu pojednáno dále v odstavci č. 4.3.2.

Složení dužiny se výrazně liší od složení slupky. V dužině se nachází velké množství cukrů, a to především glukosy a fruktosy. Z kyselin je zde obsažena hlavně kyselinu vinná a jablečná. V menší míře se zde vyskytují také třísloviny, barviva, minerální látky a vitamíny [1], [11].

Celkové zastoupení cukrů a kyselin záleží na odrůdě a klimatických podmínkách. Cukry jsou substráty alkoholového kvašení a základem výroby vína. Kromě toho se účastní vzniku dalších sloučenin, jako například vyšších alkoholů, esterů mastných kyselin a aldehydů. Takto vzniklé sloučeniny ovlivňují aroma různých odrůd vín. [3], [12].

4.1.3. Složení semen

Semena tvoří asi jen 3-4 % celkové hmotnosti bobulí. U jednotlivých odrůd se liší jak velikostí, tak tvarem i barvou. Na začátku zrání bývají pecičky většinou zelené a postupným dozráváním hnědnou a ztrácí na hmotnosti [1], [10].

V semenech jsou obsaženy bílkoviny, celulosa, minerální látky a tuky, zejména glyceridy kyseliny stearové ($C_{17}H_{35}COOH$), palmitové ($C_{15}H_{31}COOH$) a linolové ($C_{17}H_{31}COOH$). Lipidy lze ze semen lisovat a použít je jako stolní olej.

Z hlediska chuťových vlastností jsou nejdůležitější látky v semenech třísloviny. [1], [10].

4.1.4. Složení třapin

Třapiny představují 3-5 % hmotnosti hroznů. Na začátku zrání jsou zelené a obsahují velké množství vody a tříslovin. Během dozrávání hnědnou a dřevnatí a snižuje se množství kyselin a cukrů [1].

Zelené, nedozrálé třapiny mají nepříznivý vliv na chuť vyrobeného vína, způsobují tzv. chuť po třapinách, která není vhodná. Ale hnědé, zdřevnatělé třapiny dodávají vínu trpkou příchuť, která je u některých odrůd žádaná [10].

4.2. Biochemické změny při růstu a zrání hroznů

Obvykle se rozlišují tři fáze dozrávání hroznů před jejich sběrem. Je to fáze růstu hroznů, fáze dozrávání a fáze přezrávání. Jednotlivé odrůdy vín vyžadují odlišnou dobu na dozrávání, vše je ovlivněno klimatickými podmínkami, půdou či i možností napadení hroznů ušlechtilou plísní.

4.2.1 Fáze růstu hroznů

Na začátku této fáze jsou bobule vína malé, zelené a tvrdé. Postupem času dozrávají a zvětšuje se jejich objem. V této fázi je velice důležité, jaké klimatické podmínky převažují. Hrozny potřebují hlavně teplé počasí, dostatek vláhy a živin [10].

Bobule v této etapě obsahují převážně kyseliny a to kyselinu jablečnou, v menším množství kyselinu vinnou a vyskytují se zde i kyseliny jantarová (kyselina butandiová), šťavelová (ethandiová) a citronová (2-hydroxyl-1,2,3-trikarboxylová).

Obsah cukrů je v této fázi velice nízký, jejich množství se pohybuje kolem jednoho procenta hmotnosti bobule [1].

4.2.2. Fáze dozrávání

V tomto období se bobule již nezvětšují, ale mění se jejich barva a začínají měknout. Měknutí bobulí je způsobeno přeměnou protopektinu na pektin. Pektiny jsou lineární polysacharidy, jejichž základní jednotkou je kyselina galaktouronová. Tyto látky jsou obsaženy v rostlinných pletivech, respektive ve šťávě ovocných

plodů, jako je například vinná réva. Protopektiny jsou nerozpustné ve vodě, ale účinkem kyselin a enzymů se přemění na pektiny, které jsou rozpustné ve vodě [1], [12].

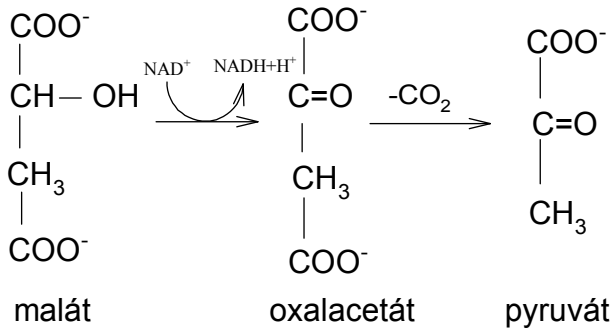
Zralé hrozny se poznají typickým zabarvením bobulí (barva bobulí se mění ze zelené na zelenožlutou u bílých odrůd a na červenou až modrou u modrých odrůd), jejich velikostí, dále tím, že jdou snadno oddělit od stopeček a že jsou měkké. Zralost se pozná i podle třapin, zda jsou seschlé, hnědé a dřevnaté [3], [10].

Rozdělujeme dva typy zralosti hroznů a to konzumní a technologickou. Konzumní je určena převážně pro stolní odrůdy, tedy pro hrozny určené k přímé konzumaci. V tomto případě se preferuje vyvážený obsah cukrů a kyselin, není zde potřeba vysoká cukernatost, proto se tyto hrozny sklízejí dříve. U technologické zralosti se vyžaduje vysoký obsah cukrů, proto se hrozny sklízejí později [10].

Během této fáze se zvyšuje obsah cukrů. Nejvíce je v hroznech zastoupena glukosa, ale postupným zráním se vyrovnává poměr mezi ní a fruktosou, takže v dozrálých bobulích je více zastoupena fruktosa [3].

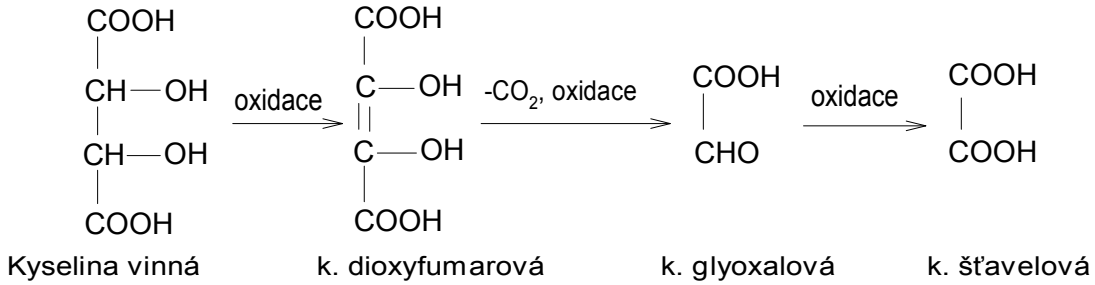
Dalším důležitým faktorem je snížení obsahu kyselin, které je způsobeno oxidací. Oxidačním procesům podléhají hlavně volné kyseliny a to jak jablečná, tak vinná, jantarová a šťavelová. Množství kyseliny citronové zůstává nezměněné. Kyseliny se mohou vázat s minerálními látkami za vzniku solí. Nejčastěji se váží s draslíkem, vápníkem a sodíkem. Z toho je patrné, že na obsahu kyselin v hroznech a pak i celkově v moštu a ve víně má vliv i množství minerální látek, které je schopna vinná réva přijmout z půdy [2].

Nejvýraznější z kvantitativního hlediska je oxidace kyseliny jablečné. Vliv na snížení jejího množství v hroznech má především oxidace a vysoké teploty. Kyselina jablečná se v přítomnosti enzymu malátdehydrogenasy a NAD^+ oxiduje na kyselinu pyrohroznovou (obr. 7), která se v glukoneogenezi využívá pro syntézu sacharidů [1].



Obr. 7 : Oxidace kyseliny jablečné

Kyselina vinná také podléhá oxidačním a dekarboxylačním procesům (obr. 9) a to až za vzniku kyseliny šťavelové, meziproduktem bývá kyselina dioxyfumarová a glykolaldehyd, který se postupnými reakcemi mění v sacharidy. Volná kyselina vinná je oproti jablečné stálejší, ale přesto se její množství v etapě dozrávání také snižuje, protože se jako volná váže do špatně rozpustných vínanů (vínan draselný a vápenatý) [1].



Obr. 8 : Oxidace kyseliny vinné [1]

Během zrání vznikají v hroznech i aromatické látky, které jsou uloženy ve slupce. Jejich množství se v různých odrůdách liší i v závislosti na postupu výroby daného vína.

4.2.3. Fáze přezrávání

Tato etapa se využívá jen při výrobě některých typů vín, například tokajských vín.

V tomto období se zastaví příjem živin, začne se vypařovat voda, bobule se začínají scvrkávat a zvyšuje se koncentrace cukrů. Při velkém odpaření vody vznikají hrozinky neboli cibéby [1].

U modrých odrůd není přezrávání výhodné, protože dochází k postupné oxidaci barviv. U aromatických odrůd, jako je například Tramín nebo Sauvignon, se tento proces také nevyužívá, protože i zde dochází k oxidaci aromatických látek, čímž by se změnila chuť a aroma typické pro tyto druhy vín.

Tento proces je typický například již u zmíněných tokajských vín, kde seschlé bobule napadá ušlechtilá plíseň *Bortrytis cinerea*. Tato vína mají po napadení plísní výraznou a specifickou chuť i aroma. Dalším příkladem botrytických vín jsou výběry z bobulí z Německa a Rakouska a Sauternes z Francie [8].

4.2.4. Sacharidy

Sacharidy jsou nejdůležitější složkou hroznů, protože vystupují jako substráty pro výrobu ethanolu.

Cukry vznikají během fotosyntézy v zelených listech vyšších rostlin. Listy zde vystupují jako tzv. zdrojové orgány. Z listů jsou sacharidy dále transportovány do tzv. zásobních orgánů (v anglicky psané literatuře označované jako sink neboli jímka), kde slouží jako zásobárna energie a jejichž uhlíkatá kostra se spolupodílí v procesu dýchání [13], [14].

Zásobní orgány jsou například hlízy brambor, semena, kořeny nebo hrozny vinné révy. Transportované sacharidy z listů jsou zde uloženy ve formě zásobních sacharidů, jako je škrob a sacharosa, a zde jsou posléze hydrolyzovány na monosacharidy [12].

Syntéza škrobu probíhá v chloroplastech a sacharosy v cytoplazmě (obr. 10).

Během fotosyntézy vznikají v chloroplastech triosa-fosfáty, které mohou být transportovány do cytosolu přes membránový přenašeč, tzv. triosa-fosfátový translokátor. V cytosolu (tekutá složka cytoplazmy) katalyzují syntézu sacharosy hlavně dva enzymy, cytosolová fruktosa-1,6-bisfosfatasa (cFBPasa, E.C. 3.1.3.11) a sacharosa-fosfátsynthasa (SPS, E.C. 2.4.1.14). Prvním krokem syntézy je vznik fruktosa-1,6-bisfosfátu ze dvou triosa-fosfátů za působení enzymu aldolasy. Enzym cFBPasa katalyzuje odštěpení anorganického fosfátu (Pi) a vznik fruktosa-6-fosfátu. Z ní působením izomerasy vzniká glukosa-6-fosfát, jehož další přeměnu na glukosa-1-fosfát katalyzuje enzym 1-epimerasa. Glukosa-1-fosfát reaguje s UTP za katalýzy UDP-glukosapyrofosforylasou (UGPasa, E.C. 2.7.7.9) a vzniká UDP-glukosa, která za katalýzy SPS spolu s fruktosa-6-fosfátem tvoří sacharosa-6-fosfát, který se

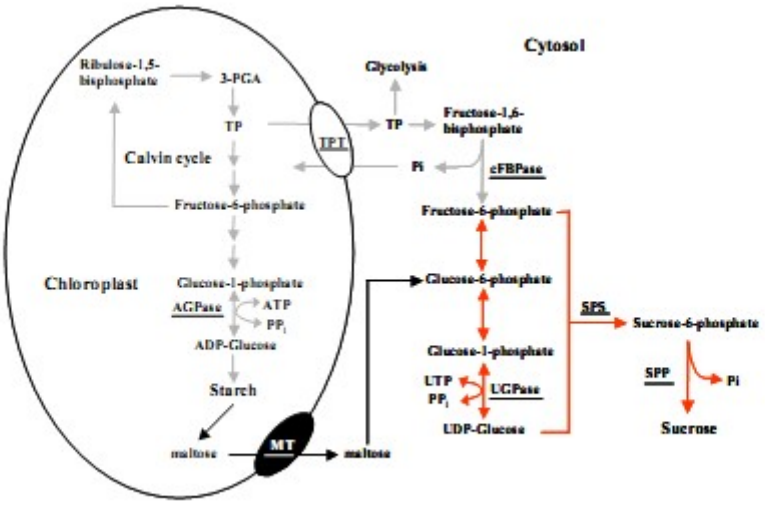
působením sacharosa-fosfátfosfatasy (SPP, E.C. 3.1.3.24) hydrolyzuje na sacharosu [13].

Syntéza sacharosy probíhá hlavně v noci, kdy se v chloroplastech zvyšuje koncentrace Pi a triosa-fosfáty mohou být přes translokátor exportovány do cytoplasmy [14].

Po syntéze sacharosy dochází k jejímu transportu do zásobních orgánů. Transport probíhá v pletivech, označovaných jako floém, jejichž hlavní vodivou látkou jsou buňky-sítkovice. V hroznech vinné révy je sacharosa transportována protonovým gradientem do apoplastů, kde je hydrolyzována invertasou na glukosu a fruktosu a vytváří tak energetickou zásobu bobulí. V dalším případě můžou být vzniklé hexosy transportovány přes hexosový transporter do cytoplasmy, kde se fosforylují kinasami a vstupují do glykolýzy, kde se odbourávají za vzniku pyruvátu, který může být dále metabolizován za produkce ethanolu [13], [14].

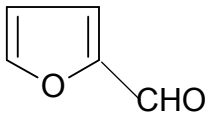
Škrob se syntetizuje v chloroplastech a za denního světla. Z triosa-fosfátů působením aldolasy vzniká fruktosa-6-fosfát, která se působením enzymu izomerasy a následně 1-epimerasy mění na glukosu-1-fosfát, která reaguje s ATP za katalýzy ADP-glukosy pyrofosforylasy (AGPasy, E.C. 2.7.7.27) za vzniku ADP-glukosy a posléze škrobu. Škrob může být transportován do zásobních orgánů, kde je hydrolyzován na glukosu.

V případě jiných rostlin může být škrob syntetizován ze sacharosy v amyloplastech (brambory) [13].



Obr. 9 : Syntéza sacharosy a škrobu; převzato z [13]. Glycolysis – glykolýza, Fructose-1,6-bisphosphatase – fruktosa-1,6-bisfosfát, Fructose-6-phosphate – fruktosa-6-fosfát, Glucose-6-phosphate – glukosa-6-fosfát, Glucose-1-phosphate – glukosa-1-fosfát, UDP-Glucose – UDP-glukosa, Sucrose-6-phosphate – sacharosa-6-fosfát, Sucrose – sacharosa, Ribulosa-1,5-bisphosphate – ribulosa-1,4-bisfosfát, Calvin cycle – Calvinův cyklus, Starch – škrob, Maltose - maltosa

Kromě výše zmíněných sacharidů se v moštu vyskytují i pentosy L-arabinosa a D-xylosa. Tyto cukry se do moštu dostávají z pevných částí hroznů při jejich zpracování a do vína se mohou dostat také díky uskladnění v dřevěných sudech. Kyselou hydrolýzou těchto cukrů vzniká furfural (furan-2-karbaldehyd) (obr. 15). Furfural spolu s dalšími látkami (vanilin, aromatické aldehydy) jsou extrahovány během zahřívání dubových sudů a ovlivňují tak aroma barikových vín nebo fortifikovaných vín, např. Madeiry. [1], [12], [16].



Obr. 10 : Furfural [17]

4.3. Zpracování hroznů na mošt a jeho složení

4.3.1. Výroba moštu

Před získáním moštu je třeba nejdříve oddělit třapiny neboli stopky od bobulí a ty posléze rozdrtit. Rozemletým bobulím se říká rmut. Odzrnění musí být prováděno s opatrností, protože hrozí, že se do rmutu dostanou zbytky třapin nebo rozemletá semínka, tím by se do něj dostaly i nežádoucí látky jako chlorofyl a třísloviny, došlo by tak ke znehodnocení vyrobeného vína [10].

Po získání rmutu následuje lisování. Jedná se o proces, při kterém se oddělí tekutá část (mošt) od pevné fáze (matoliny). Mošt je dál zpracováván na víno a matolina bývá využívaná jako krmivo. Samotné lisování se liší u jednotlivých barevných odrůd.

U červených odrůd a u bílých aromatických probíhá před lisováním nakvášení. Nakvášení rmutu je děj, při kterém se během několika hodin až dní vyluhují barviva a aromatické látky ze slupek do šťávy, které se po vylisování nacházejí v moštu a jsou typickým znakem dané odrůdy vína [3].

4.3.2. Chemické složení moštu

Voda představuje 70-80 % moštu.

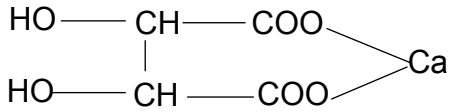
Důležitými sloučeninami, které jsou v moštu přítomny jsou již zmíněné sacharidy, které jsou nezbytnými substráty pro výrobu ethanolu a pro jiné metabolické procesy probíhající během výroby vína.

Zastoupení jednotlivých kyselin v moštu se nemění oproti jejich množství v bobulích (kapitola 1.2.). Nejvíce je zde obsažena kyselina vinná, jablečná a ve velmi malém množství i kyselina citronová. Množství ostatních kyselin jako jantarové, glykolové či šťavelové je velice nízké, záleží na odrůdách vína. Například kyselina glykolová se vyskytuje v gruzínských vínech [18].

Kyselina vinná a jablečná patří mezi dikarboxylové kyseliny. Systematický název k. vinné je kyselina 2,3-dihydroxybutandiová. Systematický název k. jablečné je kyselina hydroxybutandiová . Obě se vyskytují buď jako volné nebo jako vázané ve formě solí [3].

Kyselina vinná se v kyselém prostředí sráží s KCl za vzniku vínanu draselného COOK-CHOH-CHOH-COOH. Při nízkých teplotách je tato sloučenina

málo rozpustná a krystalizuje. Další solí, kterou kyselina vinná tvoří je vínan vápenatý (obr. 11). Tato málo rozpustná sůl vzniká při umělém odkyselení moštů působením uhličitanu vápenatého [2].

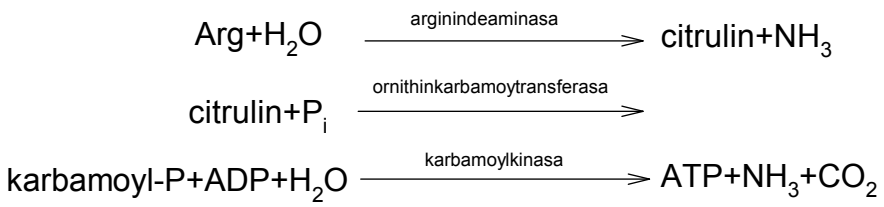


Obr. 11 : Vínan vápenatý [2]

Množství dusíkatých látek se pohybuje mezi 0,5-1,0 g/l. Dusík se v moštu a posléze i ve víně vyskytuje v různých formách. Nachází se ve formě proteinů, albumos a peptonů, polypeptidů, aminokyselin a ve formě amonných solí. Albumosy a peptony jsou peptidy o nízké molekulové hmotnosti, které vznikly při štěpení bílkovin proteolytickými enzymy. Albumosy jsou citlivé na změnu teploty, proto při určité změně koagulují a vytvářejí zákaly ve víně. Mezi nejvýznamnější volné aminokyseliny, které byly objeveny ve víně, patří arginin, prolin, kyselina glutamová a asparagová. [1], [19].

Aminokyseliny slouží během alkoholového a mléčného kvašení jako zdroj dusíku kvasinkám a bakteriím [2].

Jedna z nejdůležitějších aminokyselin je arginin. Je přítomen v hroznech, v moštu i po alkoholovém kvašení ve víně. Po alkoholovém kvašení může u kyselejších vín docházet k jablečno-mléčné fermentaci, která se děje v přítomnosti mléčných bakterií. Energii k růstu a průběhu této fermentace bakterie získávají z degradace argininu. Rozklad argininu je katalyzován třemi enzymy [20], [21]. (obr. 12)



Obr. 12 : Degradace argininu [20]

Mezi další látky, které jsou obsaženy v moštu, ale v malém množství patří enzymy, vitamíny, aromatické a buketní látky, minerální látky a tuky.

V hroznech, v moštu a ve víně se vyskytují specifické enzymy, které působí jako katalyzátory. Z negativně působících enzymů lze zmínit polyfenoloxidasu, která způsobuje hnědnutí vína. Přeměnu kyseliny jablečné na pyrohroznovou katalyzuje malátdehydrogenasa v přítomnosti koenzymu NAD^+, jde o oxidační dekarboxylaci, jejímž meziproduktem je oxalacetát. Dalšími důležitými enzymy jsou ty, které katalyzují syntézu sacharosy (cFBPasa, SPS) či škrobu a nebo degradují arginin za vzniku energie potřebné pro růst mléčných bakterií (arginindeaminasa) [1], [13], [15], [20], [21].

Z anorganických látek jsou v moštu nejvíce zastoupeny soli draslíku, vápníku a hořčíku.

4.4. Výroba vína

Výroba vín se u jednotlivých odrůd liší. Jinak se vyrábí bílé víno, červené, růžové a jiné jako například barikové víno (barrique).

4.4.1. Výroba bílého vína

Bílé víno se vyrábí ze žlutých, růžových, červených i modrých hroznů. Rozdrcením hroznů a jejich odzrněním se získá rmut, který se po vylisování mění v mošt. Po získání moštu dochází k hlavnímu kvašení za vzniku vedlejšího produktu CO_2. Kvašení se skládá ze dvou částí a to z bouřlivého kvašení, kdy se získává nejvíce alkoholu a trvá přibližně dvanáct dnů a z etapy dokvášení, která trvá čtyři týdny [3].

Kvašení probíhá bez přístupu vzduchu a při teplotě kolem 18 ^oC, jde tedy o anaerobní fermentaci. Podrobněji bude tato otázka probírána v odstavci č. 4.4.3.1.

Po fermentaci se víno nechává uzrát nejméně půl roku a poté se musí filtrovat. Filtrací se zabraňuje zákalům vína, které jsou způsobeny vysráženými bílkovinami, polysacharidy, barvivy a kvasinkami [10].

Po těchto fázích je víno připraveno na lahvování a k prodeji.

4.4.2. Výroba červeného vína

Červené víno se vyrábí z modrých odrůd. Rozdrcením hroznů a jejich odzrněním se získá rmut, který se musí nechat nakvášet, aby se získala červená barva. Doba nakvášení je přibližně 5-10 dnů při teplotě 20-25 ^{o}C. Aby se urychlilo kvašení, je dobré rmut předehřát na teplotu 20-30 ^{o}C [10].

Při nakvášení uniká CO_2, který nadnáší pevné částice rmutu, tedy slupky hroznů. Slupky vytváří tzv. matolinový klobouk na povrchu moštu. Z klobouku se za pomoci míchání, aby nedošlo k oxidaci, uvolňují potřebná barviva a buket [10].

Barva vína je důležitým znakem jeho kvality. To může ovlivnit například užití čiřícího prostředku nebo včasné síření. Nejpoužívanějším čiřícím prostředek pro zachování barvy vína je PVPP (polyvinylpolypyrolidon). Jedná se o adsorbent, který na sebe váže látky způsobující hnědnutí vína (chinony) [22].

Užití bentonitu jako čiřícího prostředku je vhodné k zabránění bílkovinných zákalů, ale jeho použitím dochází k navázání barevné složky flavonoidů, anthokyanidinu, a to způsobí ztrátu barvy a hnědnutí vína [22].

Vzniklý mošt vyrobený z červených a modrých odrůd se zpracovává stejně jako při výrobě bílého vína.

4.4.3. Základní biochemické procesy při výrobě vína a při jeho skladování (oxidace)

Nejdůležitějším procesem při výrobě vína je fermentace a to v anaerobních podmínkách, kdy vzniká alkohol a CO_2. Při aerobní fermentaci působením octových bakterií by se získala kyselina octová místo ethanolu a to je nežádoucí.

Mezi podporované procesy při výrobě vína patří jablečno-mléčná fermentace. Dalšími nežádoucími jsou mléčné kvašení a rozklad kyseliny vinné [23], [35].

4.4.3.1. Anaerobní fermentace

Anaerobní fermentace je nejdůležitější proces výroby vína, kdy během glykolýzy vzniká pyruvát a z něho za dekarboxylace a následné redukce vzniklého acetaldehydu se získá ethanol. V průběhu glykolýzy dochází k celkovému zisku čtyř molekul ATP, při čemž se 2 molekuly ATP během glykolýzy spotřebovávají a tedy celkový energetický zisk činí 2 molekuly ATP. Energetický zisk molekul ATP vystihuje následující rovnice :

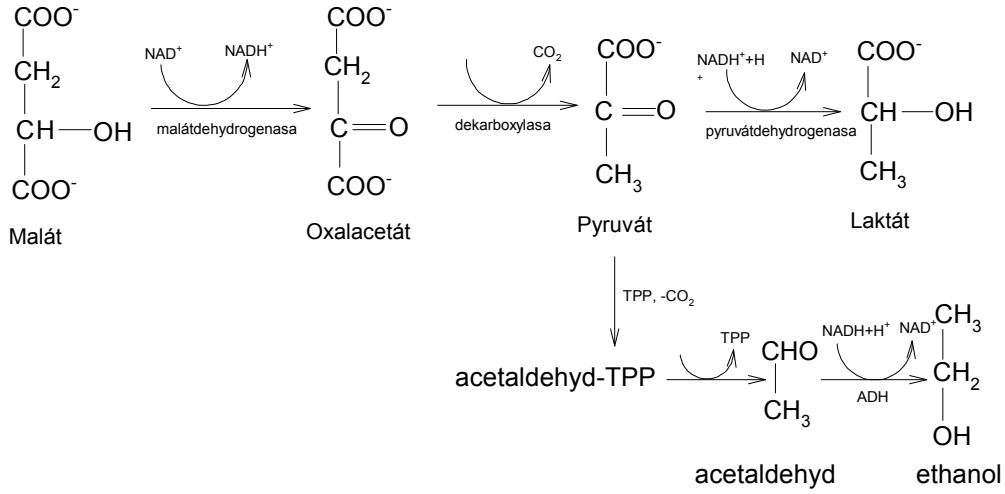
$$C_6H_{12}O_6 + 2H_3PO_4 + 2ADP \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2ATP + 2H_2O$$ [23].

4.4.3.2. Jablečno-mléčná fermentace

K jablečno-mléčné fermentaci dochází po ukončení alkoholového kvašení. Je umožněna tím, že se víno po kvasném procesu ponechá déle na kvasnicích za občasného míchání a tím dojde k odbourávání jablečné kyseliny na kyselinu mléčnou [1], [35].

Tohoto procesu se využívá ke snížení kyselosti vína. V případě, že víno obsahuje nízká množství kyselin, lze jablečno-mléčnému kvašení zabránit včasným stažením vína z kvasnic a následnou filtrací a sířením.

Snížení obsahu kyseliny jablečné způsobují různé druhy kvasinek, například *Candida sphaerica*, *Candida utilis* nebo *Sacharomyces cerevisiae* a bakterie *Leuconostoc oenos*. Tyto bakterie obsahují jablečnomléčné enzymy, které způsobují dekarboxylaci malátu na laktát (obr. 13). Jablečné enzymy způsobí redukci malátu na pyruvát, který může být dále redukován na laktát nebo působením koenzymu thiamindifosfátu (TPP) vznikne aktivovaný acetaldehyd, který se přemění na acetaldehyd, který je redukován na ethanol [4], [6], [7], [15].



Obr. 13 : Degradace kyseliny jablečné [6]

4.4.3.3. Aerobní fermentace

Aerobní fermentace neboli dýchání kvasinek je metabolický děj odehrávající se u kvasinek obdobně jako v lidském organismu. Při tomto procesu se pyruvát

(vzniklý při glykolýze) oxidativně dekarboxyluje na aktivní kyselinu octovou a poté vstupuje do Krebsova cyklu, kde se odbourává na CO_2 a redukovaný koenzym NADH, který následně vstupuje do dýchacího řetězce a reoxiduje se na oxidovaný koenzym NAD^+. Je zde vysoký zisk energie, 38 molekul ATP [1], [25].

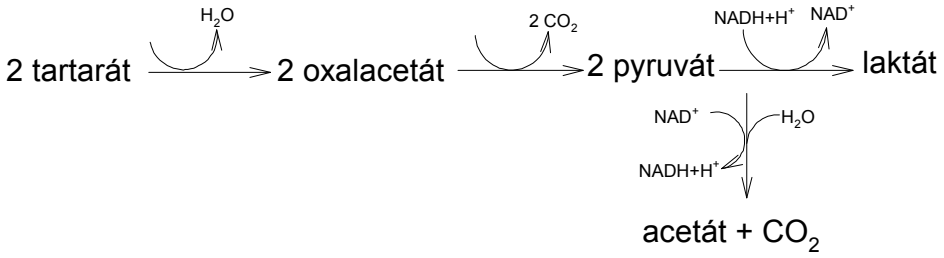
4.4.3.4. Mléčné kvašení

Mléčné kvašení je biochemickou obdobou dějů, které probíhají u člověka ve svalu při nedostatečném zásobení kyslíkem. Při mléčném kvašení jsou hlavními produkty kyselina mléčná a acetaldehyd, který se oxiduje na ethanol a kyselinu octovou působením mléčných a octových bakterií. K mléčnému kvašení dochází u vín, které obsahují zbytkový cukr (cukr, který nebyl zkvašen během alkoholového kvašení). Tento děj probíhá současně s jablečno-mléčnou fermentací při působení bakterií z rodu *Leuconostoc oenos* [6], [7], [12], [25],.

4.4.3.5. Rozklad kyseliny vinné

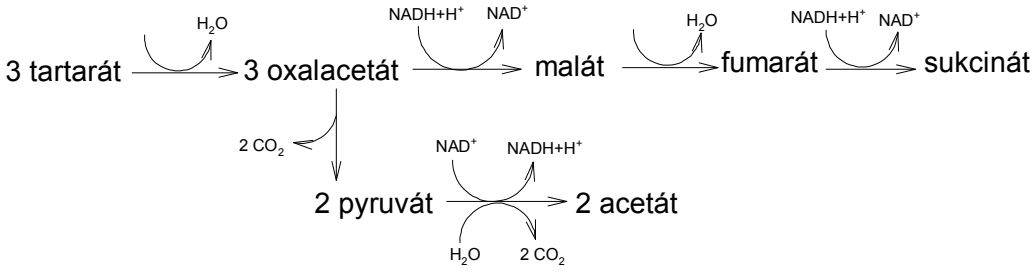
Mléčné bakterie mohou způsobit rozklad kyseliny vinné za vzniku kyseliny mléčné, octové, jantarové a CO_2. Podle druhů bakterií, které tento děj způsobují, rozlišujeme dva mechanismy rozkladu kyseliny vinné.

Při prvním způsobu rozkladu kyseliny vinné vznikají kyselina mléčná, octová a CO_2 jako produkty. Je to způsobeno bakteriemi *Lactobacillus plantarum.*(obr. 14)



Obr. 14 : Mechanismus rozkladu k. vinné bakteriemi *Lactobacillus plantarum*[1]

Během druhého vznikají ze tří molekul k. vinné čtyři molekuly CO_2, dvě molekuly kyseliny octové a k. jantarová. Tento mechanismus způsobují bakterie *Lactobacillus brevis* [1]. (obr. 15)



Obr. 15 : Druhý mechanismus rozkladu kyseliny vinné [1]

4.4.3.6. Oxidace vína a změna barvy

Oxidaci výrazně ovlivňuje kyslík a enzymy. Kyslík reaguje s oxidovatelnými sloučeninami a tím ovlivňuje kvalitu moštu a budoucího vína. Hlavní látky, které se ve víně oxidují, jsou fenolické látky, organické kyseliny (kyselina vinná a askorbová) a ethanol.

Fenolické látky (flavonoidy ve víně) podléhají oxidačně-redukčním procesům. Tyto látky se v mladém víně vyskytují jako volné sloučeniny, ale během oxidace podléhají polymerizačním reakcím za vzniku dimerů, trimerů a oligomerů [26]-[29].

Enzymová oxidace je způsobena polyfenoloxidasou a peroxidasou. Oba enzymy se nacházejí v hroznech. K enzymové oxidaci dochází hlavně před alkoholovou fermentací, kdy dochází ke zpracování hroznů a nakvášení, které probíhá za přístupu kyslíku.

Flavonoidy podléhají oxidaci vzdušným kyslíkem katalyzované polyfenoloxidasou za vzniku chinonů, tím se mění zabarvení moštu na hnědou skořicovou barvu u bílých i červených vín. Redukční činidla jako kyselina askorbová a SO_2 zabraňují nechtěné oxidaci.

V malém množství je kyselina askorbová přítomna v hroznech a jejím působením dochází k redukci vzniklých chinonů na původní flavonoidy, sama se přitom oxiduje na kyselinu dehydroaskorbovou [6], [7], [11], [26].

SO_2 se přidává do vína v pevné či plynné fázi. Váže se acetaldehydem vzniklým během alkoholové fermentace. Tento komplex inhibuje růst bakterií, které způsobují hnědnutí vína [24].

Dalším způsobem, jak zabránit oxidaci, je inhibice enzymů pomocí teploty. Velmi vysoké teploty mezi 70-90 ^oC inhibují účinky polyfenoloxidasy [1].

Přítomnost velkého množství organických kyselin v hroznech také inhibuje enzym polyfenoloxidasu.

Zmíněné oxidace probíhaly hlavně v moštu, tedy před výrobou vína. Po alkoholovém kvašení, ve vínu, probíhá oxidace působením vzdušného kyslíku a jako katalyzátory jsou přítomny ionty Fe^{2+} a Cu^{2+}. Kyslík proniká do vína neustále i přes póry sudů či zátky během uskladnění [1], [26] - [28].

Molekulární kyslík reaguje s oxidovatelnými látkami a přitom se sám redukuje v několika krocích až na dvě molekuly H_2O, přičemž odnímá oxidovaných látkám celkem čtyři elektrony (obr. 16). Tato reakce vede ke tvorbě superoxidu (O_2^-) a peroxidu (O_2^{2-}). Tyto anionty jsou lepšími oxidačními činidly než vzdušný kyslík (O_2) a oxidují fenolické látky na chinony a ethanol na acetaldehyd [26], [27], [30].

$$O_2 \xrightarrow{e^-, H^+} HO_2^- \xrightarrow{e^-, H^+} H_2O_2 \xrightarrow{e^-, H^+} \cdot OH \xrightarrow{e^-, H^+} (2)\ H_2O$$

Obr. 16 : Vznik peroxidu a superoxidu [26]

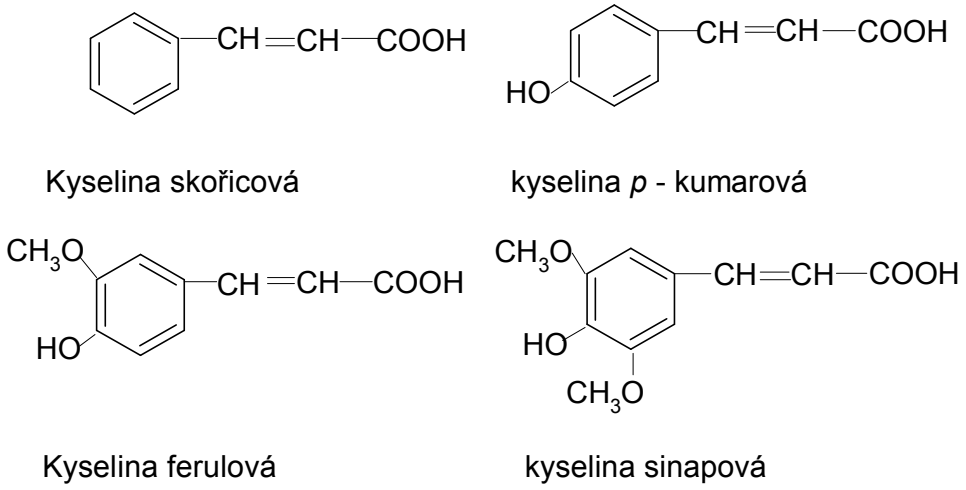
Redukční činidla (SO_2 spolu s kyselinou askorbovou) a vhodná zátka a místo uskladnění vína mohou zpomalit oxidaci vína.

Korek nebo jiná zátka chrání víno v lahvi před oxidací vzdušným kyslíkem a před pronikáním jiných látek dovnitř, včetně mikroorganismů, kapalin a plynů.

Chemické složení korkové zátky je různé, liší se oblastí pěstování dubu korkového. Přibližné složení je: suberin (33-50 %), lignin (13-29 %), polysacharidy (6-25 %), vosky (2-8 %), taniny (6-7 %), extrakty z dubu (8-24 %), popel (2-3 %), ostatní (6-7 %).

Suberin je tvořen z alifatických polyesterů, tedy z mnoho uhlíkatých mastných kyselin a fenolů. Jeho funkcí je zadržování vody a působí jako antimikrobiální bariéra.

Lignin je součástí sekundární vnitřní buněčné stěny korku, která je dále obklopena vrstvou obsahující suberin a vosky a vrstvou, která je tvořena polysacharidy. Lignin vzniká biosynthesou z aminokyseliny fenylalaninu přes kyselinu skořicovou, *p*-kumarovou, ferulovou a sinapovou (obr. č. 17) [12], [27].



Obr. 17 : Kyseliny podílející se na biosyntéze ligninu [12]

Špatně ošetřený korek může způsobit vadu vína, tzv. chuť po korku. Tato vada se projevuje zatuchlou vůní vína, které může mít navíc plesnivou příchuť. Je to způsobeno tím, že se korky bělí a sterilizují v roztocích obsahujících chlor. Tyto roztoky reagují s fenoly, které jsou obsaženy v korku za vzniku sloučeniny trichloranisolu, který se rozpouští ve víně a způsobuje plesnivou chuť. Plastové zátky jsou v tomto případě výhodnější, protože neobsahují reaktivní sloučeniny a nedochází k vadám vína [31].

5. Cíle práce

Cílem mé bakalářské práce bylo seznámit se s literaturou, popisující biochemické aspekty výroby vína, a zejména procesů, které mohou ve víně probíhat během jeho zrání, skladování či přepravy, a během stárnutí vína. Dále jsem se měla seznámit se základními analytickými přístupy k hodnocení kvality vína.

V experimentální části byla předkládaná bakalářská práce zaměřena na aplikaci poznatků z teoretické části při charakterizaci dvou vzorků stejné odrůdy bílého vína s rozdílným zabarvením. Pro srovnání byly stejné charakteristiky stanoveny i pro vzorek červeného vína. Aby bylo možno odhadnout vliv stárnutí vína, byly některé charakteristiky stanoveny znovu po uplynutí čtrnácti dnů od otevření lahve. Dále byl studován vliv zvýšené teploty.

Data, získaná v naší laboratoři, byla doplněna o výsledky speciálních stanovení (se zaměřením na obsah flavonoidů a antioxidantů), provedených v laboratoři doc. Ing. R. Kizka, Ph.D.

Kromě chemických parametrů byly hodnoceny také změny senzorické vlastnosti zkoumaných vín (barva, chuť a aroma) a jejich změny během stárnutí.

6. Experimentální část

Celkový plán experimentální části byl založen na srovnání charakteristik dvou vzorků bílého vína stejné odrůdy od stejného výrobce, které se viditelně lišily barvou. Pro srovnání a s ohledem na získání zkušeností se soupravou, která byla komerčně dostupná, byl obdobně analyzován také vzorek červeného vína. Analýzy byly provedeny hned po otevření, po týdnu (uchování v chladu při teplotě kolem 5 °C) a po simulovaném stárnutí (21 hodin v termostatu při 37 °C). Vzorky byly uskladněny za přístupu vzduchu a za tmy. Experimentální data, získaná v naší laboratoři, byla doplněna experimenty, provedenými na Mendelově zemědělské univerzitě v Brně (v laboratři doc. Ing. Reného Kizka, Ph.D. specializované na elektrochemickou analýzu).

6.1. Chemikálie a roztoky

Pro analýzu byly vybrány dva vzorky bílých vín odrůdy Chardonnay značky "Brise de France", ročník 2008, oblast pěstování jižní Francie. Oba vzorky,které se viditelně lišily barvou, byly současně zakoupeny v supermarketu TESCO, takže lze předpokládat, že podmínky uskladnění byly zhruba stejné. Vzorky se lišily kromě barvy číslem šarže a jak se ukázalo, tak i typem uzávěru.

Víno A – číslo šarže : L0912093S2, plastová zátka.

Víno B – číslo šarže: L2605093S1, korková zátka (lisovaná).

Pro srovnání byla stanovení prováděna i u červeného vína odrůdy Modrý Portugal ročník 2007, které bylo zakoupeno rovněž v supermarketu. Výrobcem vína bylo Víno Rimavska Sobota, s.r.o. oblast pěstování byla Malokarpatská, Slovensko.

Ke stanovení jednotlivých parametrů ve víně byly použity roztoky z komerčně dostupné soupravy Malá vinařská laboratoř. Dodavatelem byly BS Vinařské potřeby s.r.o. Velké Bílovice. Výrobce neudává složení jednotlivých zkoumadel, obsažených v soupravě, která celkem obsahuje 10 roztoků označených písmeny A až Z. V této práci nebyly využity všechny dodávané roztoky, použila jsem pouze následující (uvedené je i předpokládané chemické složení, odhadnuté na základě práce s literaturou) [2], [33]:

roztok A – činidlo na stanovení volného a celkového SO_2 ve víně

- pravděpodobně se jednalo o roztok H_2SO_4 a škrobu

roztok B – činidlo na stanovení volného a celkového SO_2

- pravděpodobně šlo o roztok jódu

roztok Z – činidlo na stanovení redukujících cukrů a SO_2

- předpoklad: roztok vínanu sodno-draselného a NaOH (Fehlingovo činidlo II)

roztok C – činidlo na stanovení redukujících cukrů

- předpoklad: roztok $CuSO_4 . 5H_20$ (Fehlingovo činidlo I)

roztok T – činidlo na stanovení termolabilních bílkovin

- asi se jednalo o kyselinu fosfomolybdenovou

roztok K – činidlo na stanovení titrovatelných kyselin

- pravděpodobně šlo o roztok NaOH s barevným indikátorem,např. bromthymolovou modří

Další chemikálie a roztoky

- kalibrační pufry pro měření pH (pH=4,01, pH=7,00), (dodavatel Sevac Česká republika) a roztoky pro úpravu pH a měření titrační křivky

- běžné chemikálie (p.a., Lachema):

- roztoky HCl (1M), NaOH (1M), H_2SO_4 (25%)

- roztok jódu (0,05M, f=0,098, poskytnut z laboratoře katedry Analytické chemie)

- roztok škrobu (poskytnut z laboratoře katedry Anal. chemie)

-kalibrační roztoky na měření vodivosti (K_C=1110 $\mu S.cm^{-1}$, $K_{A,B}$=1413 $\mu S.cm^{-1}$), (Hanna Instruments)

- aktivní uhlí

6.2. Přístroje

HP spektrofotometr 8453 (Agilent Technologies, USA) byl použit pro měření spekter v UV a VIS oblasti v rozsahu vlnových délek 200- 800 nm v čase 1 s.

Abbeův refraktometr (Carl Zeiss, Jena, Německo) byl použit pro měření indexu limu u bílých vín.

pH-metr (Research pHmeter PHM 64 s elektrodou GK2401B; Radiometer, Dánsko) byl použit na měření pH daných vzorků vín a při měření titrační křivky.

Termostat (IR 1500, Flow Laboratories, USA) byl použit pro zahřátí vzorků vín na teplotu 37 ^{o}C, kdy se simulovalo stárnutí vín v závislosti na teplotě.

Konduktometr HI 9033 (Hanna Instruments, Itálie) byl použit na měření vodivosti vzorků vín.

Automatická byreta TITRONIC basic (Schott, Německo) byla použita při měření titrační křivky. Pomocí ní bylo možno dávkovat titrační činidlo (roztok kyseliny chlorovodíkové) s přesností na 0,01 ml.

Hustoměr (rozsah 0,940-1,000 g.cm^{-3}, 1,000-1,060 g.cm^{-3}) a **pyknometr** byly použity na stanovení hustoty jak bílých, tak i červených vín.

6.3. Metody

Stanovení jednotlivých parametrů ve vínu bylo prováděno podle návodu výrobce soupravy Malá vinařská laboratoř. Pouze u experimentů stanovení termolabilních bílkovin a volného SO_2 se objem použitého vína snížil na polovinu oproti návodu, a tím i objemy použitých činidel.V soupravě byly obsaženy již zmíněné roztoky a také činidla ke stanovení sirovodíkového pachu ve víně a čiření vína. Tyto roztoky a suspenze nebyly využity.

Dále jsou uvedeny metody, které byly provedeny kolegy na Mendelově zemědělské univerzitě v Brně a které sloužily ke stanovení antioxidačních aktivit a celkových fenolických látek.

6.3.1. Metody stanovení parametrů ve víně podle soupravy Malá vinařská laboratoř

Stanovení redukujících cukrů

Ke stanovení redukujících cukrů ve víně byly použity roztoky C (5 ml) a Z (1 ml). Oba roztoky byly postupně přidány k 5 ml vzorku vína a směs byla zahřívána po dobu 5 minut. Přítomnost a množství redukujících sacharidů se projevila barevnou změnou vzorku. Zabarvení do oranžova indukuje přítomnost redukujících cukrů v množství větším než 5g/l, při modrém zbarvení je jich méně než 5g/l.

Stanovení termolabilních bílkovin

Ke stanovení termolabilních bílkovin byl použit roztok T (0,5 ml). Objevení zákalu do půl hodiny od dávkování činidla, ukazuje na velmi nestabilní víno s obsahem termolabilních bílkovin. Vytvoření zákalu do třech hodin od dávkování odpovídá nestabilnímu vínu, absence zákalu svědčí o stabilitě vína.

Stanovení titrovatelných kyselin

Ke stanovení obsahu titrovatelných kyselin byl použit roztok K. Titroval se jím vzorek vína do barevné změny (modro-zeleného zabarvení u bílých vín nebo černého u červených vín). Objem spotřebovaného titračního činidla K se rovná množství titrovatelných kyselin v g/l.

Stanovení volného a celkového SO_2

Ke stanovení volného SO_2 byly použity roztoky A (2 ml) a B (3 ml) a pro stanovení celkového SO_2 roztoky A, B a Z. Jako titrační činidlo sloužil roztok B. Konec titrace se projevil barevnou změnou, u bílého vína se roztok zabarvil do fialova a u červeného do černa. K výpočtu množství volného i celkového SO_2 se objem použitého titračního činidla násobil dvaceti. Získaná hodnota udává obsah příslušné formy SO_2 v mg/l.

Pro stanovení celkového SO_2 v červeném vínu po expozici v termostatu (37 °C, 21 hodin) byly k 5 ml vzorku vína přidány postupně roztoky: 25% H_2SO_4 (1,5 ml), 1M NaOH (2,5 ml), škrobu (1,5 ml) a jódu (0,05M). Titračním činidlem byl roztok jódu. Objem spotřebovaného jódu se vynásobil 25 a tím se získalo množství celkového SO_2 ve víně [2]. V literatuře jsou uvedeny jiné objemy vzorku vína a činidel. Vína C bylo použito 10 x méně než v návodu, proto i objemy činidel jsou 10 x nižší.

6.3.2. Spektrofotometrické metody

Měření UV/VIS spekter bylo provedeno na HP 8453 v rozsahu vlnových délek 200-800 nm, s intergračním časem 1 s. Jako srovnávací vzorek byla použita destilovaná voda.

Spektrofotometr typu HP je jednopaprskový , tj. nejdříve byla použita referentní kyveta s destilovanou vodou a poté byl změřen zkoumaný vzorek.

6.3.3. Konduktometrie

Vodivost je způsobena elektricky nabitými částicemi, ionty, které se pohybují v elektrickém poli. Vodivost je u slabých elektrolytů spojena se stupněm disociace a ten závisí na hodnotě disociační konstanty a na celkové analytické koncentraci elektrolytů.

Výsledné hodnoty byly uváděny v $\mu S.cm^{-1}$ u bílých vín a u červeného v $mS.cm^{-1}$.

6.3.4. Orientační stanovení hustoty využitím hustoměru a pyknometru

Orientační stanovení hustoty se provádělo pomocí hustoměru. Ponořením hustoměru do vína a v závislosti na jeho ponoru se na stupnici odečetla hustota vzorku. Hustota byla uváděna v $g.cm^{-3}$.

Určení relativní hustoty pomocí pyknometru bylo provedeno také orientačně. Nejdříve se zvážil prázdný a vysušený pyknometr, poté pyknometr naplněný destilovanou vodou a nakonec zkoumaným vínem. Hustota odpovídá poměru hmotnosti vína ku hmotnosti vody při laboratorní teplotě (kolem 23 ^{o}C).

6.3.5. Měření titrační křivky

Měřením titrační křivky se stanovilo jaké kyseliny jsou obsaženy v jednotlivých vínech. Jelikož jsou vína se svým nízkým pH kyselé roztoky, byly nejprve neutralizovány NaOH. Po zneutralizování se vzniklý roztok titroval kyselinou chlorovodíkovou. Přidával se vždy stejný objem a po každém přídavku HCl se odečítala hodnota pH. Následně se sestrojila titrační křivka.

6.4. Chemikálie, přístroje a metody analýz prováděné na Mendelově univerzitě v Brně

6.4.1. Chemikálie a roztoky

Mobilní fáze A – Kyselina citronová (75mM), amonium acetát (25mM)

Mobilní fáze B – 100% acetonitril

Reagencie metody DPPH – 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH$^{\bullet}$, 9,5.10^{-5}M), DMSO (dimethylsulfoxid).

Reagencie u metody FRAP – 2,4,6-tripyridyl-s-triazin (TPTZ, 10mM), HCl (40mM), $FeCl_3$ (20mM), acetátový pufr (0,02M, pH=3,6).

Reagencie u metody TEAC – 2,2′-azinobis(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonová kyselina (ABTS, 7mM), peroxodisíran draselný.

6.4.2. Přístroje

HPLC-ED systém – byl složen ze dvou chromatografických pump Model 582 ESA (Chelmsford, MA), pracovní rozsah byl 0,001-9,999 ml.min^{-1}. A dále z chromatografické kolony Gemini C18 (150 x 4,6, velikost částic 3µm, Phenomenex, USA). K elektrochemické detekci byl použit dvanácti-kanálový detektor Coularray (ESA, USA). Vzorek byl injektován do autosampleru (Model 542, ESA, USA).

Přístroj pro metodu FRAP – pro stanovení antioxidační aktivity byl použit automatický spektrofotometr BS-400 (Mindray, China).

Přístroj pro stanovení celkových polyfenolů – byl použit dvoupaprskový UV-VIS spektrofotometr Specord 210 (Chromspec, ČR) s chlazeným polovodičovým detektorem pro měření v rozsahu 190-1100 nm s ovládáním z externího PC s programem WinASPECT.

6.4.3. Metody

Stanovení konkrétních fenolických látek pomocí HPLC-ED

Vzorek vína byl injektován automaticky pomocí autosampleru na kolonu, která byla termostatovaná na 32 ^{o}C. Průtok mobilní fáze byl 1 ml.min^{-1}. Mobilní fáze

se skládala z roztoku A: kyseliny citronové (75mM) a amonium acetátu (25mM) a z roztoku B: 100% acetonitrilu. Detekce separovaných látek probíhala na elektrochemickém detektoru při 600 mV. Doba analýzy byla 45 min. Vzorky A a B (bílá vína) byly přímo nastříknuty do systému. Vzorek C (červené víno) byl nejdříve naředěn.

Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody DPPH

DPPH$^\bullet$ test je založen na schopnosti stabilního volného radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu reagovat s donory vodíku. Během tohoto testu se po redukci antioxidantem (AH) nebo radikálem (R$^\bullet$) roztok odbarví dle následující reakce:

$$DPPH^\bullet + AH \rightarrow DPPH^\bullet H + A^\bullet$$

$$DPPH^\bullet + R^\bullet \rightarrow DPPH^\bullet\text{-}R$$

Absorbance byla měřena při vlnové délce λ=515 nm.

Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody FRAP

Tato metoda (Ferric reducing antioxidant power) je založena na redukci železitých komplexů, např. TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazinu) s hexakyanoželezitanem draselným $K_3[Fe(CN)_6]$ nebo chloridem železitým $FeCl_3$, za vzniku modře zabarvených železnatých komplexů. Metoda FRAP pouze odráží schopnost látek redukovat ion Fe^{3+}. Absorbance byla měřena při vlnové délce λ=578 nm.

Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody TEAC

Metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) je nejčastěji užívaná metoda pro stanovení množství radikálů, které mohou být zneškodněny nějakým antioxidantem, tj. jde o stanovení celkové antioxidační kapacity. Antioxidační aktivita se sleduje fotometricky na základě změny absorpčního spektra ABTS (λ=670 nm).

Stanovení celkových fenolických látek

Ke stanovení celkových fenolických látek bylo použito Folin-Ciocalteuovo činidlo. Reakce je založena na redukci fosfomolybdenového komplexu fenolických látek za vzniku modrého zabarvení. Vzorek byl inkubován s činidlem při teplotě

22 ^{o}C a po dobu 30 min. Absorbance byla měřena při vlnové délce λ=670 nm. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalentní množství kyseliny gallové v mg.100 g^{-1}.

7. Výsledky

Experimentální část byla založena na stanovení jednotlivých parametrů ve víně v závislosti na stáří při různých teplotách. Jak už bylo zmíněno dříve, prvním výzkumem bylo porovnání bílých vín stejné odrůdy, značky, ročníku, které se ale lišily barvou a šarží. Druhým experimentem bylo stanovení jednotlivých parametrů u červeného vína a tyto výsledky bílého a červeného vína porovnat.

Získané výsledky experimentů byly doplněné o antioxidační vlastnosti vín a zastoupení jednotlivých fenolických sloučenin za spolupráce kolegů na Mendelově zemědělské univerzitě v Brně.

7.1. Bílá vína

7.1.1. Senzorické hodnocení vína A a vína B

Senzorické hodnocení se provádělo podle tabulky č. 1 a degustace se účastnili tři kolegové. Výsledky odpovídají převládajícímu hodnocení.

V následující tabulce jsou rozdíly vín A a B podle senzorického hodnocení, čerstvě od otevření a po týdnu. Nejpatrnější rozdíl mezi jednotlivými víny byla barva. Vína byla stejná, lišily se pouze číslem šarže, barvou a zátkou.

Víno A bylo uzavřeno plastovou zátkou a jeho barva byla tmavě žlutá, toto zabarvení dávalo dojem, že víno už je z části zoxidované. Víno B bylo uzavřeno korkovou zátkou a barva byla světle žlutá. Zabarvení odpovídalo dané odrůdě.

Tabulka č. 1 : Senzorické porovnání vín A a B

	Víno A		Víno B	
	Čerstvé	**Po týdnu**	**Čerstvé**	**Po týdnu**
Čistota (vzhled)	Čiré, čisté	Čiré, čisté	Čiré, světlé	Čiré, čisté
Barva	Tmavě žlutá	Světle žlutá	Světle žlutá	Velmi světlá žlutá
Vůně	Výrazná, po kovu	Méně čistá, nasládlá, po květinách	Jemná, sladká vůně po ovoci	Méně čistá
Chuť	Hřejivá, těžká až alkoholická, výrazné kyseliny	Neharmonická, těžká až alkoholická, nahořklá	Jemná, hřejivá, příjemné kyseliny	Neharmonická až alkoholická, zvětralá

7.1.2. Změřené parametry vína A

V následující tabulce č. 2 jsou změřená množství redukujících cukrů, titrovatelných kyselin, volného a celkového oxidu siřičitého, která jsem získala ihned po otevření vína, po týdnu v chladu a po 21 hodinách v termostatu při teplotě 37 ^{o}C.

Tabulka č. 2 : Obsah jednotlivých složek vína A během stárnutí

	Čerstvé	**Po týdnu v chladu**	**Po inkubaci v termostatu**
Bílkoviny	Stabilní víno	Stabilní víno	Stabilní víno
Cukry [g/l]	Více jak 5	Více jak 5	Více jak 5
Kyseliny [g/l]	5,75	5,50	5,35
Volný SO_2 [mg/l]	9,00	6,00	6,70
Celkový SO_2 [mg/l]	57,5	48,9	49,9
pH	3,49	3,40	3,40

Jak je patrné z tabulky, největší změny během stárnutí vína A nastaly u obsahu kyselin, jejichž množství se snížilo jak při uchování v chladu, tak i po inkubaci v termostatu. A u volného a celkového SO_2 jehož obsah se snížil během uskladnění v nízkých teplotách a naopak mírně vzrostl po inkubaci v termostatu oproti chladnějším podmínkám.

7.1.3. Změřené parametry vína B

Parametry vzorku B bílého vína jsou shrnuty v tabulce č. 3. V zásadě jsou stanovené hodnoty dosti podobné vzorku A, pouze obsah volného SO_2 ve vzorku B je poněkud vyšší, zatímco obsah celkového SO_2 je naopak o něco nižší.

Tabulka č . 3 : Obsah jednotlivých složek vína B během stárnutí

	Čerstvé	**Po týdnu v chladu**	**Po inkubaci v termostatu**
Bílkoviny	Stabilní víno	Nestabilní víno	Nestabilní víno
Cukry [g/l]	Více jak 5	Více jak 5	Více jak 5
Kyseliny [g/l]	6,00	5,66	5,36
Volný SO_2 [mg/l]	12,8	7,60	10,0
Celkový SO_2 [mg/l]	52,3	44,6	46,4
pH	3,36	3,40	3,37

Podobně jako u vína A, mění se i u vína B obsah kyselin a SO_2 během stárnutí, ať už v chladu nebo po inkubaci v termostatu. Došlo ke snížení množství titrovatelných kyselin a SO_2, zejména po týdnu v chladu za přístupu vzduchu v chladu. Víno B vykazovalo v testu na termolabilní bílkoviny nestabilitu během stárnutí.

7.1.4. Fyzikálně – chemické parametry vín A a B

V následující tabulce č. 4 jsou shrnuty experimentálně stanovené fyzikálně-chemické parametry obou vzorků bílého vína, jako je hustota, vodivost a index lomu.

Jak ukazuje srovnání, rozdíly v těchto parametrech jsou prakticky zanedbatelné. Pouze vodivost vzorku B byla poněkud vyšší ve srovnání se vzorkem A.

Tabulka č. 4 : Fyzikálně-chemické parametry vín A a B

	Víno A	**Víno B**
Hustota (hustoměr) [g.cm^{-3}]	0,994	0,993
Hustota (pyknometr)$_{rel}$	0,995	0,996
Index lomu	1,338	1,337
Vodivost [µS.cm^{-1}]	1630	1510

7.2. Červené víno

7.2.1. Senzorické hodnocení vína C

V následující tabulce č. 5 jsou výsledky senzorického hodnocení červeného vína ihned po otevření a po týdnu. Hodnocení bylo zpracováno stejně jako v případě bílých vín.

Jak je vidět z tabulky, nejsou zde téměř žádné rozdíly, až na změnu chutě a vůně, ale na rozdíl od bílého vína tyto rozdíly nejsou nijak výrazné.

Láhev byla uzavřena korkovou lepenou zátkou.

Tabulka č. 5 : Senzorické hodnocení vína C ihned po otevření a po týdnu

	Víno C	
	Čerstvé	**Po týdnu**
Čistota (vzhled)	Čiré, čisté	Čiré, čisté
Barva	Rubínová	Rubínová
Vůně	Výrazná, vynikající	Těžká
Chuť	Jemná trpká s příjemnými třísloviny	S výraznými třísloviny (trpká), drsná

Stárnutím došlo ke ztrátám výrazných chuťových a aromatických vlastností, které byly hodnoceny jako zhoršení kvality vína.

7.2.2. Změřené parametry vína C

Následující tabulka č. 6 shrnuje nacházejí experimentálně zjištěné hodnoty obsahu jednotlivých složek vína ihned po otevření, po týdnu v chladu a po 24 hodinách v termostatu.

Tabulka č. 6 : Obsah jednotlivých složek vína C během stárnutí

	Čerstvé	**Po týdnu v chladu**	**Po inkubaci v termostatu**
Bílkoviny	Velmi nestabilní	Velmi nestabilní	Velmi nestabilní
Cukry [g/l]	Méně jak 5	Méně jak 5	Méně jak 5
Kyseliny [g/l]	5,10	4,75	4,50
Volný SO_2 [mg/l]	31,0	31,0	30,0
Celkový SO_2 [mg/l]	65,4	66,2	64,0
pH	3,77	3,77	3,75

Jak je patrné z tabulky, největší změny během stárnutí nastaly v obsahu kyselin. Na rozdíl od bílých vín, kde se množství celkového SO_2 po inkubaci v termostatu lehce zvyšovalo oproti nízkým teplotám, zde dochází k jeho snížení. Obsah volného SO_2 se snížil až po 24 hodinách v termostatu. Jednalo se o velmi nestabilní víno z pohledu obsahu termolabilních bílkovin. Během stárnutí vína C docházelo oproti bílým vínům k nepatrným změnám v obsahu jednotlivých parametrů.

7.2.3. Fyzikálně - chemické parametry vína C

V tabulce č. 7 jsou experimentálně stanovené parametry jako je vodivost a hustota. Srovnání s hodnotami pro bílá vína ukazuje, že červené víno má poněkud vyšší hustotu a výrazně vyšší vodivost.

Tabulka č. 7 : Fyzikálně-chemické parametry vína C

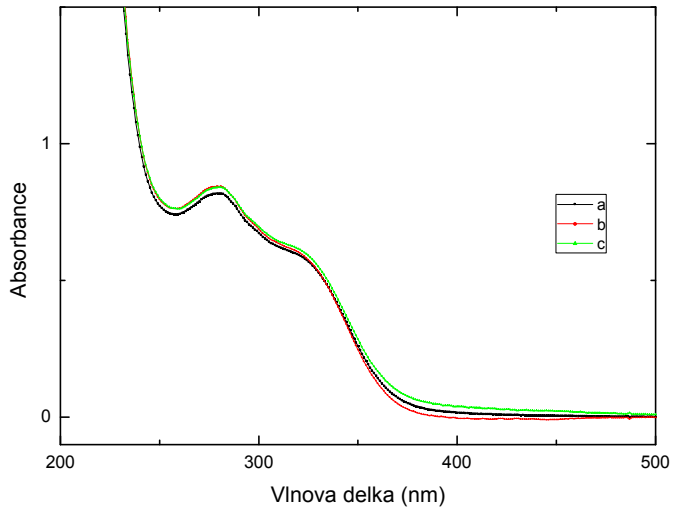
	Víno C
Hustota (hustoměr) [g.cm^{-3}]	1,000
Hustota (pyknometr)$_{rel}$	1,017
Vodivost [mS.cm^{-1}]	2,300

7.3. Spektra

Všechny vzorky vín získané během stárnutí byly naředěny 11x (v poměru 1 díl vzorku vína ku 10 dílům vody). Spektra byla vždy změřena po otevření vína, po týdnu v chladu a po uchování v termostatu a vždy proti destilované vodě.

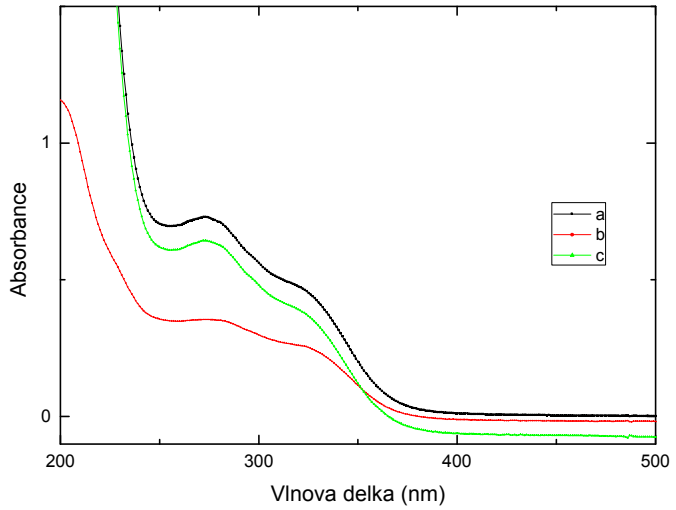
7.3.1. Porovnání spekter vína A a B

Na obrázku č. 18 jsou spektra vína A po otevření, po týdnu v chladu a po uchování v termostatu. Spektra se od sebe nijak výrazně nelišila. V grafu jsou patrné dva výrazné píky při vlnových délkách kolem 280 nm a 330 nm. Hodnoty vlnových délek odpovídají absorpci aromatických aminokyselin a flavonům.



Obr. č. 18: Porovnání spekter vína A během stárnutí. Černá křivka (a) – čerstvé víno, červená křivka (b) – vzorek A po týdnu, zelená křivka (c) – víno A po inkubaci v termostatu.

Na obrázku č. 19 jsou spektra vína B, stejně jako u vzorku A měřená ihned po otevření, po uchování v chladu a po inkubaci v termostatu. Absorpční vrcholy se nacházely přibližně u stejných vlnových délek, byly však poněud nižší, než u vzorku A. Tento rozdíl zřejmě odpovídá rozdílným zabarvení vín. Nejvíce absorbujících látek bylo v čerstvém vínu a následně ve vzorku, který byl přes noc v termostatu. Nejméně látek bylo ve vzorku, který byl týden uchován v chladu. Při měření tohoto spektra mohlo dojít k chybě, protože se velice liší od zbylých dvou spekter.

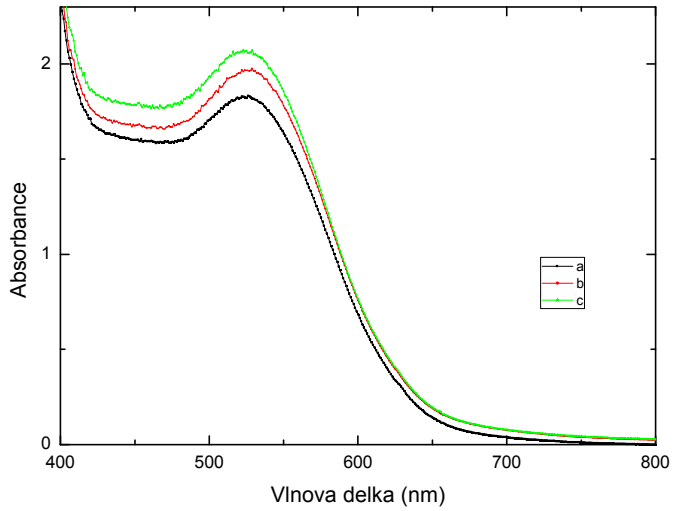


Obr. č. 19: porovnání spekter vína B během stárnutí. Černá křivka (a) – čerstvé víno, červená křivka (b) – vzorek B po týdnu, zelená křivka (c) – po inkubaci v termostatu

7.3.2. Spektra vína C

Spektrum červeného vína se podle očekávání výrazně lišilo od bílých vín.

Víno C bylo také zředěno stejně jako v předchozích případech. Spektrum je zobrazeno na obrázku č. 20. Výrazný je zde pouze jeden pík a nachází se v oblasti 520 nm. Tato absorpční oblast odpovídá antokyaninům. V červeném víně jsou patrně nejvíce zastoupenými složkami anthokyaniny, které převažují nad ostatními látkami, proto se ve spektru vyskytuje pouze jeden pík.

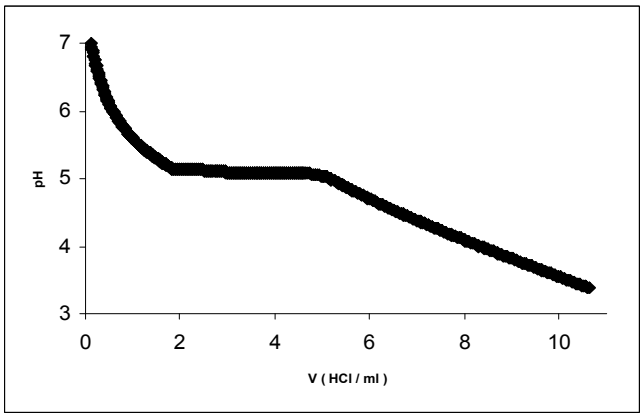


Obr. č. 20: Porovnání spekter vína C. Černá křivka (a) – čerstvé víno C, červená křivka (b) – vzorek C po týdnu, zelená křivka (c) – víno C po inkubaci v termostatu.

7.3.3. Porovnání titračních křivek

Z obrázků titračních křivek (Obr. č. 21, 22, 23) jsou patrné rozdíly jejich průběhu. Odpovídá to rozdílnému zastoupení jednotlivých kyselin v daných vínech. Titrační křivky byly meřeny po dvou týdnech od otevření vín A, B, C.

Na titrační křivce na obr. č. 21 je výrazná "prodleva" při hodnotě pH 5,1-5,0. Tato část odpovídá maximu pufrační kapacity vzorku A. Ve srovnání s hodnotami pK_a v tabulce č. 8 vyplývá, že tato část křivky odpovídá svojí hodnotou pH disociační konstantě kyseliny jablečné, která je tedy zřejmě nejvíce zastoupenou kyselinou ve vínu A.

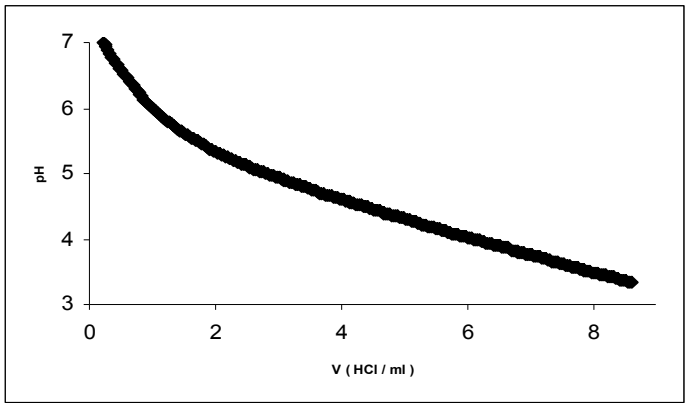


Obr. 21: Průběh titrační křivky vína A. pH se odečítalo vždy po přídavku 0,01 ml HCl

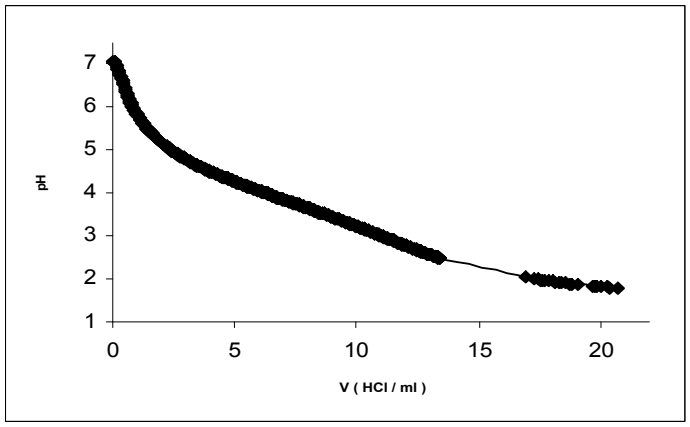
Tabulka č. 8: pK_a kyselin vyskytujících se ve víně

Kyselina	$pK_{a,1}$	$pK_{a,2}$	$pK_{a,3}$
citronová	3,15	4,77	6,40
jablečná	3,46	5,21	0
vinná	3,01	4,34	0
šťavelová	1,27	4,27	0
mléčná	3,86	0	0
octová	4,76	0	0

U dalších dvou vzorků B a C (obr. 22 a 23) se podobná "prodleva" nevyskytuje, nelze tedy předpokládat, že by v nich výrazně převažovala některá z daných kyselin.



Obr. 22 : Průběh titrační křivky vína B. pH se odečítalo vždy po přídavku 0,03 ml HCl



Obr. 23 : Průběh titrační křivky vína C. pH se odečítalo vždy po přídavku 0,03 ml HCl

7.4. Další stanovení prováděné na MZU v Brně

V následující tabulce č. 9 jsou výsledné antioxidační aktivity změřené podle metod DPPH, FRAP, ABTS a celkové fenolické sloučeniny udávány v mg kyseliny gallové na litr.

Tabulka č. 9 : Antioxidační aktivity

Vzorek	**DPPH**	**FRAP**	**ABTS**	**Celkové polyfenoly**
A	32,5	30,5	20,2	427,1
B	76,2	23,3	19,5	464,8
C	65,2	30,4	22,1	79,4

V následující tabulce č. 10 se nacházejí množství různých fenolických látek obsažených ve vínech.

Tabulka č. 10 : Zastoupení fenolických látek ve vínech A, B a C

	Koncentrace v µg / ml		
Analyt	**A**	**B**	**C**
Gallová kyselina	0,48	1,11	20,04
p-aminobenzoová k.	n. d.	n. d.	3,29
p-kumarová k.	0,29	0,36	1,89
Chlorogenová k.	1,02	1,05	1,32
Kávová k.	5,63	3,86	8,91
Vanilin	0,02	0,01	0,50
3,4-dihydroxybenzoová k.	2,70	2,97	2,07
Ferulová k.	0,28	0,11	0,16
Rutin	0,78	0,49	0,07
Quercitrin	0,09	0,00	1,33
Resvestratol	0,13	0,04	0,80
Quercetin	1,77	0,72	3,90

8. Diskuse

8.1. Bílá vína

Rozdíly ve vínech A a B byly patrné už po senzorickém hodnocení. Obě vína se lišila, především barvou. To byl hlavní důvod k porovnání obou lahví vína, další rozdíly byly patrné i v chuti a vůni.

Víno A bylo patrně lehce zoxidováno, proto byla barva tmavě žlutá. Této odrůdě vína odpovídá spíše světle žlutá barva a ovocná vůně [33]. Vůně tohoto vzorku byla výrazná, ale spíše nepříjemně, byly zde hodně cítit kyseliny a kovy, které se odrazily i v chuti.

Druhé víno bylo světle žluté, tato barva odpovídala odrůdě Chardonnay [33], jeho vůně byla příjemná, lehce nasládlá a chuť byla jemná, nevynikaly zde výrazně žádné složky vína.

Rozdíly mezi oběma vzorky mohly být způsobeny špatným uskladněním a jiným uzavřením vína, protože víno A bylo uzavřeno plastovou zátkou a víno B korkovou zátkou. Víno se oxiduje i po ukončení alkoholového kvašení, jelikož molekuly kyslíku O_2 pronikají skrze póry sudu a zátky a dále při manipulaci s vínem. Zajímavé je, že bylo zčásti zoxidované víno A, které bylo uzavřené plastovou zátkou, ta by měla být odolnější vůči prostupu kyslíku než korková zátka. V tomto případě byla odolnější vůči oxidaci korková zátka. Ovlivňuje to pravděpodobně chemické složení korku, který obsahuje suberin. Jedná se o sloučeninu zabraňující pronikání vody a působící jako antimikrobiální bariéra [27]. Pravděpodobně největší vliv na kvalitu daných vín mělo uskladnění. Jiná možnost, proč se vybraná vína lišila, bylo že měly rozdílné šarže a tudíž byly stáčeny v jinou dobu a mohly se také měnit podmínky uskladnění, nebo se nemuselo jednat o stejná vína, mohly se lišit oblastí pěstování nebo to mohly být namíchané různé odrůdy.

O tom zda se jednalo o namíchané odrůdy či nikoliv se dá uvažovat pouze v závislosti na obsahu jednotlivých složek, na etikekách totiž nebylo uvedeno, o jaký druh vína se jedná, zatímco v ČR se tato informace uvádí. V České republice podle Zákona o vinohradnictví a vinařství č. 115/1995 Sb. se vína třídí na stolní, jakostní a přívlastková aj. Hrozny stolních vín musejí dosáhnout 11^{o} cukernatosti, mošty se mohou docukřovat a víno nesmí být označeno názvem odrůdy ani názvem oblasti.

Jakostní víno se vyrábí z hroznů, které dosáhly nejméně 15° cukernatosti. Odrůdové jakostní víno musí obsahovat nejméně 85% odrůdy uvedené na etiketě. Vína přívlastková se podle stupňů cukernatosti hroznů dělí do dalších skupin. Tato vína musí obsahovat nejméně 85% odrůdy uvedené na etiketě. Tato vína se nesmí přicukrovat [34].

Po týdnu od otevření vína A se nejvíce změnila vůně a to k lepšímu. Tentokrát byla nasládlá, byla cítit po květinách a nepřevažovala zde vůně kyselin. To svědčí o snížení kyselin ve víně, jak je patrné z tabulky č. 2. Došlo zřejměk oxidaci kyselin. Chuť byla stejná a barva se také výrazněji nezměnila.

U vína B se po týdnu od otevření nejvíce změnila chuť, která už nebyla příjemná jako po otevření, ale byla už zvětralá a víno bylo cítit po alkoholu. Vůně se také změnila, nebyla už příjemně nasládlá, ale byla stejně jako chuť zvětralá.

Při senzorickém hodnocení největší roli ve změně vůně, barvy a chutě vína měla zřejmě oxidace vzorků.

Z tabulek č. 2 a 3 je patrné, že vína A a B se lišila obsahem kyselin, to mělo vliv i na kvalitu a stabilitu těchto vín. Je to dáno tím, že čím je větší obsah kyselin a nižší hodnota pH, tím je víno stabilnější a tím je odolnější vůči oxidacím [1]. Více kyselin obsahovalo víno B, které také vykazovalo vyšší stabilitu oproti vínu A, které jich obsahovalo méně a bylo tedy i zčásti zoxidované.

Stárnutím po otevření se obsah kyselin snižoval. Tento děj je způsoben tím, že kyseliny ve víně nejsou stálé, podléhají různým enzymovým i neenzymovým oxidačním procesům. Tyto procesy jsou urychleny působením kovů, které jsou též obsaženy ve víně. Například působením železa na kyseliny vzniká ve víně štavelan železnatý a vínan železnatý. Tyto soli mají i v malém množství katalytickou schopnost. To umožňuje, že se za přístupu vzduchu, kyslíku oxiduje kyselina vinná na kyselinu dioyfumarovou, ta se oxiduje na kyselinu diketojantarovou, která poté podléhá dekarboxylaci. Po dekarboxylaci vzniká aldehyd kyseliny mesoxalové. Dalšími oxidacemi a dekarboxylacemi poté vzniká až kyselina šťavelová. Tato oxidace kyseliny vinné až na kyselinu šťavelovou vede ke ztrátě původní chuti a buketu [1], [2].

Obsah volného i celkového oxidu siřičitého ve víně se měnil v závislosti na teplotě, při které bylo víno uskladněno. Po otevření lahve byl jeho obsah nejvyšší a poté se snižoval. Výrazněji se snížilo množství SO_2 po týdnu při nízké teplotě než po

21 hodinách při teplotě 37 °C. V závislosti na formě oxidu siřičitého, v jaké se vyskytuje ve víně, je pravděpodobně jeho obsah ovlivněn teplotou. Ve víně existují dvě formy SO_2 a to volný a vázaný.

Volný SO_2 se ve víně slučuje s vodou a vzniká tak kyselina siřičitá H_2SO_3. Oxidací této kyseliny vzniká kyselina sírová H_2SO_4, která reaguje s draslíkem za vzniku síranu draselného K_2SO_4, který ve víně zůstává. Jeho množství se musí hlídat, aby nedošlo ke změně kvality a buketu vína [15].

Vázaný SO_2 se váže například s acetaldehydem či cukry nebo s aminokyselinami. Volný acetaldehyd ve víně způsobuje zvětralou příchuť, proto je dobré přidávat SO_2, aby k tomuto jevu nedocházelo [1].

Celkové snížení množství oxidu siřičitého je dáno jeho vyprcháním.

Oxid siřičitý ovlivňuje stabilitu a kvalitu vína, zabraňuje jeho oxidaci. Protože víno A obsahovalo méně volného SO_2, bylo zčásti zoxidované a tím méně kvalitní. Vzorek B obsahoval více volného SO_2, a tím bylo lépe zabráněno oxidaci.

Fyzikálně-chemické parametry vín jsou téměř stejné, jediné v čem se nejvíce liší je vodivost. Vodivost je způsobena elektricky nabitými částicemi, ionty, které se pohybují v elektrickém poli. Vodivost je u slabých elektrolytů spojena se stupněm disociace a ten závisí na hodnotě disociační konstanty a na celkové analytické koncentraci. Z toho vyplývá, že rozdíl v hodnotách vodivosti je způsoben rozdílným obsahem zastoupení jednotlivých kyselin ve vínech, díky tomu se liší i hodnoty pKa a tím i vodivost a hodnota pH, tento rozdíl je patrný i při srovnání titračních křivek.

Obsah redukujících cukrů se nezměnil, ke změnám by došlo po delší době od otevření, kdy by došlo opět ke kvasnému procesu.

Ke srážení bílkovin dochází díky změnám teploty. Víno A bylo podle naměřených hodnot a senzorického hodnocení méně stabilní a kvalitní, ale bylo odolné vůči vzniku bílkovinných zákalů. Víno B po změnách teplot vykazovalo přítomnost termolabilních bílkovin. Z toho vyplývá, že se v tomto případě jednalo o nestabilní víno v závislosti na změnách teplot. Bílkovinné zákaly jsou ovlivněny teplotou, okysličením a různými složkami vína, se kterými mohou bílkoviny koagulovat za vzniku zákalů.

Z naměřených parametrů je patrné, že stabilnější bylo víno B, ale podle změřených spekter nastaly menší změny u vína A. Podle velikosti píků je možné

porovnat zastoupení absorbujících látek ve vínu. U vína B byly píky nižší a tedy obsahovalo méně absorbujících látek.

8.2. Červené víno

Jak je patrné z tabulek č. 5 a 6, k příliš velkým změnám během stárnutí vína nedošlo, ani v měřených chemických parametrech, ani při senzorickém hodnocení. Tento děj je dán tím, že červená vína obsahují mnohem více flavonoidů. Tyto látky se řadí mezi sekundární rostlinné metabolity a mají vysoké antioxidační účinky. Právě díky velkému obsahu antioxidantů víno nepodléhá tak rychle oxidaci jako je tomu u bílého vína [4], [9].

V případě vína C se jednalo o velmi nestabilní víno. Bílkovinný zákal se vytvořil do patnácti minut od dávkování činidla, to odpovídá velmi nestabilnímu vínu z hlediska přítomnosti termolabilních bílkovin.

Obsah redukujících cukrů se nezměnil. Chuť vína byla velice trpká, byl zde znát poměrně vysoký obsah třísloviny a kyselin, to odpovídá množství redukujících cukrů (nižší než 5 g/l).

Množství titrovatelných kyselin bylo velmi nízké a stárnutím po otevření se snižoval. Tento děj je způsoben stálou přítomností vzdušného kyslíku a neustálou oxidací, která je urychlena přítomností kationtů kovů, které působí jako katalyzátory.

Obsahy volného a celkového SO_2 se téměř neměnily. Jak už bylo řečeno, červené víno obsahuje hodně antioxidantů, proto nedošlo k oxidaci SO_2.

Vodivost je poměrně vysoká, ve víně C je obsaženo hodně elektricky nabitých částic.

8.3. Porovnání bílého a červeného vína

Bílé a červené víno se liší množstvím jednotlivých složek, a to hlavně obsahem flavonoidů. Červená vína obsahují více flavonoidů a tím i více antioxidačních látek. Tato skutečnost vede k tomu, že bílé víno podstatně rychleji podléhá nežádoucí oxidaci. Tato příčina je patrná z tabulek č. 1 a 5. U bílých vín se výrazně změnila barva, vůně i chuť po týdnu od otevření vína, ale u červeného se nepatrně změnila pouze vůně a chuť, barva zůstala stejná.

Bílá vína A a B obsahovala více titrovatelných kyselin než červené víno C a měla tak i nižší pH. Stabilnější vína jsou ta, která obsahují více kyselin a mají nízké

hodnoty pH, v tom případě nepodléhají tak rychle oxidaci. V případě těchto experimentů bylo stabilnější víno červené, které sice obsahovalo méně kyselin a tím mělo i vyšší hodnotu pH, ale obsahovalo více antioxidantů, což způsobilo jeho větší stabilitu.

Faktor, který ovlivnil množství cukrů ve vínech byly klimatické podmínky. V teplejších oblastech, jako je například jižní Francie, jsou vína sladší než v chladnějších oblastech, jako je například Slovensko. Proto víno C obsahovalo méně redukujících sacharidů než vína A, B, která pocházela z jižní Francie [10].

Množství celkového a volného SO_2 ve víně ovlivňuje vinař. Proto se jednotlivá vína od sebe liší v množství tohoto konzervačního prostředku. Jeho snížení během stáří je ovlivněno přirozeným vyprcháním, ale i oxidací a navázáním na jiné sloučeniny, které jsou ve vínu přítomny, jako je například acetaldehyd a voda [1], [15].

Výrazné rozdíly mezi červenými a bílými vykazovaly i fyzikálně-chemické parametry. Bílá vína měla nižší hustotu než červené víno. Je to způsobeno pravděpodobně tím, že v červeném víně jsou více zastoupeny složky, které bílé víno neobsahuje v takové míře, jako jsou například třapiny a flavonoidy. Vodivost elektrolytů roste s klesající koncentrací, tzn. že v červeném víně bude obsaženo těchto elektrolytů méně (je to patrné u obsahu kyselin), proto byla naměřena vyšší vodivost u vzorku C.

8.4. Antioxidační aktivita (zjištěná kolegy na MZU v Brně)

Množství jednotlivých sloučenin s antioxidační aktivitou byla ve vínech A a B v některých případech značně rozdílná. Z tabulky č. 8 je patrné, že vína A a B, která se mezi sebou lišila pouze barvou a šarží, s největší pravděpodobností nebudou tatáž vína, ale bude se jednat o namíchaná vína z odlišných odrůd.

Z mých experimentů bylo patrné, že červené víno C obsahuje nejvíce antioxidačních látek, protože se množství jednotlivých parametrů během stárnutí výrazně neměnilo. Ale z tabulky č. 9 to zřejmé není. Na stanovení antioxidačních aktivit byly použity tři metody a výsledky se od sebe velice lišily. V případě, že budeme předpokládat, že červené víno C nepodléhá tak rychle oxidaci jako bílá vína A a B, byla by nejvhodnější metoda ABTS, kde vzorek C měl nejvyšší oxidační aktivitu. V případě zbývajících metod jsou výsledky velmi překvapivé a příliš

neodpovídají mým experimentům. Vyjasnění těchto výsledků bude vyžadovat provedení dalších experimentů, např. specifických srovnávacích studií.

9. Závěr

V práci byly stanoveny rozdíly v obsahu jednotlivých složek u bílých a červených vín v závislosti na teplotě a na stárnutí. Prokázalo se, že i když se jedná o stejnou značku vína a ročník, které se liší pouze šarží a zabarvením, že se nemusí jednat o stejné víno, ale pravděpodobně jde o různé směsi. Výsledky ukázaly, že nejstabilnější vína, která odolají jak změnám teplot a oxidacím, jsou červená vína, která obsahují vyšší množství antioxidantních látek. Charakter vína během stárnutí nejvíce ovlivňuje oxidace, teplota a způsob uskladnění.

10. Literatura

[1] Farkaš J.: *Technologie a biotechnologie vína*. NTL, Bratislava 1980

[2] Laho L., Minárik E.: *Vinárstvo II*. SNTL, Bratislava 1959

[3] Soleas G. J., Diamandis E. P., Goldberg D. M.: *J. Clin. Lab. Anal.* 11 (1997) 287-313

[4] Maicas S., Pardo I., Ferrer S.: *World J. Microbiol. Biotechnol.* 15 (1999) 737-739

[5] Vodrážka Z.: *Biochemie 3*. Academia, Praha 1993

[6] Funel A. L.: *Antonie van Leeuwenhoek* 76 (1999) 317-331

[7] Davis C. R., Wibiwo D. J., Lee T. H., Fleet G. H.: *Appl. Environ. Microbiol.* 51 (1986) 539-545

[8] Jackson R. S.: *Wine Tasting : A Professional Handbook*. Academic Press, Ontario, 2009

[9] Mori K., Yamamoto N. G., Kitayama M., Hashizume K.: *J. Exp. Bot.* 58 (2007) 1935-1945

[10] Kraus V., Hubáček V., Ackermann P.: *Rukověť vinaře*. Nakladatelství Brázda, Praha 2010

[11] Tronchoni J., Gamero A., Lopéz F. N. A., Barrio E., Querol A.: *Int. J. Food Microbiol.* 134 (2009) 237-243

[12] Kindl, H., Weber, G.: *Biochemie rostlin*. Academia, Praha 1981, první vydání

[13] Chen S.: *Role and significance of sucrose-6-phosphate phosphatase in regulating sucrose biosynthesis and carbon partitioning in photosynthetic and non-photosynthetic tissues*, Disertační práce, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 2005

[14] Šantrůček J.: Přednášky *Transport asimilátů a rozpuštěných látek v rostlině*, Katedra fyziologie rostlin, PřF JU v Českých Budějovicích, dostupné na stránkách: http://www.kfr.jcu.cz/download/lectures/KBE562/KBE562_09-2010.ppt, poslední přihlášení 5.5. 2011

[15] Bauer R., Dicks L. M. T.: *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 25 (2004) 74-88

[16] Camara J. S., Alves M. A., Marques J. C.: *Anal. Chim. Acta* 563 (2006) 188-197

[17] McMurry, J.: *Organická chemie*. (český překlad), VUTIUM, Brno 2007

[18] Masár M., Kaniansky D., Bodor R., Jöhnck M., Stanislawsky B.: *J. Chrom. A* 916 (2001) 167-174

[19] Kiewer W. M.: *J. Food Sci.* 34 (1969) 274-278

[20] Spano G., Beneduce L., Tarantino D., Giammanco G. M., Massa S.: *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18 (2002) 821-824

[21] Liu S.-Q., Pritchard G. G., Hardman M. J., Pilone G. J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 310-316

[22] Plaza E. G., Munoz R. G., López J. M., Roca A., Cutillas M., Fernández J. I. F.: *Legend.-Wiss. Technol.* 35 (2002) 46-53

[23] Rose A. H.: *History and Scientific Basis of Alcoholic Beverage Production*. V knize *Alcoholic beverages* (Rose, A. H., ed.), Academic Press, Bath 1977

[24] Junker R. E., Goswell R. W.: *Table* wines. V knize: *Alcoholic beverages* (Rose A., H., ed.), Academic Press, Bath 1977

[25] Saayman M., Bloom M. V.: *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 27 (2006) 113-122

[26] Toit W. J., Marais J., Pretorius I. S., Toit M.: *J. Enol. Vitic.* 27 (2006) 76-94

[27] Karbowiak T., Gougeon R. D., Alinc J. B., Brachais L., Debeaufort F., Voilley A., Chassagne D.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutrit.* 50 (2010) 20-52

[28] Toit W. J.: *The effect of oxygen on the composition and mikrobiology of red wine*, Disertační práce, Stellenbosch University, 2006

[29] Ferreira A. C. S., Pinho P. G., Rodriques P., Hogg T.: *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 5919-5924

[30] Osborne J. P., Pilone G. J., Liu S. –Q.: *FEMS Microbiol. Lett.* 191 (2000) 51-55

[31] http://www.unitedbrands.cz/korky.php, poslední přihlášení 23.5. 2011

[32] Davídek J. a kolektiv: *Laboratorní příručka analýzy potravin*. SNTL, Praha 1977

[33] http://www.briesedefrance.com, poslední přihlášení 6.5. 2011

[34] http://vinitorium.sweb.cz/cz/zakon.html, poslední přihlášení 21.5. 2011

[35] Funel A. L. : *FEMS Microbiol. Lett.* 126 (1995) 209-214