



**Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně**  
**Fakulta technologická**

Ing. Pavel Hanuštiak

# **NOVÉ JAKOSTNÍ MARKERY HROZNOVÉHO VÍNA**

**NEW GRAPE WINE QUALITY MARKERS**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Program P2901 Chemie a technologie potravin

Obor 2901V013 Technologie potravin

Školitel doc. Ing. Jan Hrabě, Ph.D.

Konzultant doc. Ing. Josef Balík, Ph.D.

Zlín 2012

## **ABSTRAKT**

Předložená dizertační práce se zabývá problematikou vína a biologickým odbouráváním kyseliny L-jablečné. Cílem práce bylo prostudovat změny v obsahu vybraných markerů kvality v hroznovém víně v závislosti na provedení řízeného odbourávání kyseliny L-jablečné pomocí bakterií mléčného kvašení. V práci byly realizovány tři části experimentů (příprava analytických metod a dva praktické experimenty s reálnými vzorky z výroby vína). Probíhající změny byly sledovány pomocí metod chemické analýzy a statisticky porovnány. Z výsledků vyplývá, že malolaktická fermentace mění množství markerů v závislosti na použité starterové kultuře i odrůdě révy vinné.

**Klíčová slova:** hroznové víno, malolaktická fermentace, markery kvality, kapalinová chromatografie

## **ABSTRACT**

This study is focused on wine and the biological fermentation of L-malic Acid. The aim of the work was to study concentration changes of selected grape wine quality markers in relation to controlled malolactic fermentation using lactic acid bacteria. The experiment was in three parts: preparation of the analytical methods and two practical experiments with wine samples. Changes were observed using chemical analysis methods, and these were then statistically compared. The results show that malolactic fermentation changes the amount of markers depending on the starter culture and the vine varietal.

**Keywords:** grape wine, malolactic fermentation, quality markers, liquid chromatography

Znalost vína může být radostí po celý život člověka.  
*Ernest Hemingway*

*Poděkování:*

Na tomto místě bych rád poděkoval mému školiteli doc. Ing. Janu Hraběti, Ph.D. za cenné rady, připomínky, odborné vedení, trpělivost a čas, kterou mi věnoval nejen při psaní této dizertační práce, ale po celou dobu studia. Stejný dík patří také mému konzultantovi doc. Ing. Josefu Balíkovi, Ph.D. Dále chci poděkovat mým kolegyním a kolegům, kteří mi pomáhali konzultovat jednotlivé analýzy, poskytli mi cenné rady a připomínky a svými zkušenostmi mi usnadňovali průchod studiem i psaním dizertační práce. Všech jejich poznámek, připomínek a rad si nesmírně vážím a jsem za ně vděčný. Mé velké díky patří i mým nejbližším, mé rodině a přítelkyni. Jejich finanční i morální podpora mi byly vždy oporou.

Tato práce byla finančně podpořena Výzkumným záměrem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky „Multifunkční kompozitní soustavy na bázi přírodních a syntetických polymerů“ (MSM 7088352101) a Interními granty UTB ve Zlíně č. IGA/15/FT/10/D a IGA/FT/2012/028.

# OBSAH

<b>ABSTRAKT</b> .....	2
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>SEZNAM ILUSTRACÍ</b> .....	6
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	7
<b>1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	9
1.1. Víno a suroviny pro jeho výrobu .....	9
1.2. Technologie výroby révového vína.....	9
1.3. Metody úpravy kyselosti při výrobě vína .....	12
1.3.1. Úprava kyselosti u moštu .....	13
1.3.2. Úprava kyselosti mladého vína po hlavním kvašení .....	14
1.4. Malolaktická fermentace .....	15
1.5. Bakterie mléčného kvašení ve víně.....	17
1.5.1. <i>Metabolismus BMK ve víně</i> .....	18
1.6. Markery kvality révového vína .....	20
1.6.1. <i>Organické kyseliny</i> .....	21
1.6.2. <i>Biogenní aminy</i> .....	23
1.6.3. <i>Dikarbonylové sloučeniny</i> .....	24
1.6.4. <i>Antioxidanty</i> .....	26
<b>2 CÍLE PRÁCE</b> .....	29
<b>3 ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ</b> .....	30
3.1. Fáze I .....	30
3.2. Fáze II.....	30
3.3. Fáze III .....	30
3.4. Metodika získávání vzorků .....	31
3.4.1. <i>Vzorky hroznového vína pro fázi II</i> .....	31
3.4.2. <i>Vzorky hroznového vína pro fázi III</i> .....	31
3.5. Použité metody analytické chemie.....	32
3.6. Statistické metody zpracování dat.....	32
<b>4 VÝSLEDKY PRÁCE A DISKUZE</b> .....	34
4.1. Výsledky a diskuze k fázi I .....	34
4.1.1. <i>Stanovení organických kyselin</i> .....	34
4.1.2. <i>Stanovení dikarbonylových sloučenin</i> .....	36
4.1.3. <i>Stanovení obsahu biogenních aminů</i> .....	39
4.1.4. <i>Stanovení obsahu antioxidantů</i> .....	40
4.2. Výsledky a diskuze k fázi II.....	43
4.2.1. <i>Výsledky a diskuze stanovení organických kyselin</i> .....	44
4.2.2. <i>Výsledky a diskuze stanovení diacetylu</i> .....	52
4.2.3. <i>Výsledky a diskuze stanovení biogenních aminů</i> .....	53
4.2.4. <i>Výsledky a diskuze stanovení antioxidantů</i> .....	59
4.3. Výsledky a diskuze k fázi III.....	62
4.3.1. <i>Výsledky a diskuze stanovení dikarbonylových sloučenin</i> .....	63
4.3.2. <i>Výsledky a diskuze stanovení biogenních aminů</i> .....	66

4.3.3.	<i>Výsledky a diskuze stanovení antioxidantů</i> .....	69
<b>5</b>	<b>PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI</b> .....	73
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	74
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b> .....	75
<b>8</b>	<b>SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA</b> .....	90
<b>9</b>	<b>CV AUTORA</b> .....	92

## SEZNAM ILUSTRACÍ

<i>Obr. 1</i> Podrobné schéma přeměny glukózy na etanol [2] .....	11
<i>Obr. 2</i> Schéma hlavní reakce malolaktické fermentace [2].....	16
<i>Obr. 3</i> Mechanismus přeměn probíhajících při metabolické přeměně kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou u BMK pomocí malolaktického enzymu [3] ....	19
<i>Obr. 4</i> Podrobné schéma přeměny kyseliny citronové na diacetyl [2] .....	26
<i>Obr. 5</i> Závislosti plochy píku na koncentraci standardních roztoků kyseliny vinné, L-jablečné a L-mléčné .....	36
<i>Obr. 6</i> Závislosti plochy píku na koncentraci standardních roztoků kyseliny citronové, octové a jantarové.....	36
<i>Obr. 7</i> Závislosti plochy píku na koncentraci standardních roztoků glyoxalu, metylglyoxalu, diacetylu a pentandionu .....	39
<i>Obr. 8</i> Molekula 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu.....	41
<i>Obr. 9</i> Závislost absorbance na koncentraci standardních roztoků kyseliny gallové .....	42
<i>Obr. 10</i> Závislost úbytku absorbance na koncentraci standardních roztoků kyseliny L-askorbové .....	43

## SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1</i> Bakterie mléčného kvašení ve víně [3] .....	18
<i>Tab. 2</i> Obsah kyseliny vinné u vína odrůdy Cabernet Moravia .....	44
<i>Tab. 3</i> Obsah kyseliny L-jablečné u vína odrůdy Cabernet Moravia .....	44
<i>Tab. 4</i> Obsah kyseliny L-mléčné u vína odrůdy Cabernet Moravia.....	45
<i>Tab. 5</i> Obsah kyseliny citronové u vína odrůdy Cabernet Moravia.....	45
<i>Tab. 6</i> Obsah kyseliny octové u vína odrůdy Cabernet Moravia .....	46
<i>Tab. 7</i> Obsah kyseliny jantarové u vína odrůdy Cabernet Moravia .....	46
<i>Tab. 8</i> Obsah kyseliny vinné u vína odrůdy Zweigeltrebe .....	48
<i>Tab. 9</i> Obsah kyseliny L-jablečné u vína odrůdy Zweigeltrebe .....	48
<i>Tab. 10</i> Obsah kyseliny L-mléčné u vína odrůdy Zweigeltrebe.....	49
<i>Tab. 11</i> Obsah kyseliny citronové u vína odrůdy Zweigeltrebe .....	49
<i>Tab. 12</i> Obsah kyseliny octové u vína odrůdy Zweigeltrebe .....	50
<i>Tab. 13</i> Obsah kyseliny jantarové u vína odrůdy Zweigeltrebe .....	50
<i>Tab. 14</i> Obsah diacetylu u vína odrůdy Cabernet Moravia .....	52
<i>Tab. 15</i> Obsah diacetylu u vína odrůdy Zweigeltrebe .....	52
<i>Tab. 16</i> Obsah histaminu u vína odrůdy Cabernet Moravia .....	54
<i>Tab. 17</i> Obsah fenyletylaminu u vína odrůdy Cabernet Moravia .....	54
<i>Tab. 18</i> Obsah putrescinu u vína odrůdy Cabernet Moravia.....	55
<i>Tab. 19</i> Obsah spermidinu u vína odrůdy Cabernet Moravia.....	55
<i>Tab. 20</i> Obsah fenyletylaminu u vína odrůdy Zweigeltrebe.....	56
<i>Tab. 21</i> Obsah putrescinu u vína odrůdy Zweigeltrebe.....	56
<i>Tab. 22</i> Obsah spermidinu u vína odrůdy Zweigeltrebe .....	57
<i>Tab. 23</i> Celkový obsah polyfenolů u vína odrůdy Cabernet Moravia.....	59
<i>Tab. 24</i> Celkový obsah polyfenolů u vína odrůdy Zweigeltrebe .....	60
<i>Tab. 25</i> Celková antioxidační aktivita u vína odrůdy Cabernet Moravia .....	61
<i>Tab. 26</i> Celková antioxidační aktivita u vína odrůdy Zweigeltrebe.....	61
<i>Tab. 27</i> Obsah glyoxalu ve vzorcích vína z pokusné fáze III.....	63
<i>Tab. 28</i> Obsah metylglyoxalu ve vzorcích vína z pokusné fáze III.....	64
<i>Tab. 29</i> Obsah diacetylu ve vzorcích vína z pokusné fáze III.....	65
<i>Tab. 30</i> Obsah pentandionu ve vzorcích vína z pokusné fáze III .....	66

<b>Tab. 31</b>	<i>Obsah histaminu ve vzorcích vína z pokusné fáze III.....</i>	67
<b>Tab. 32</b>	<i>Obsah putrescinu ve vzorcích vína z pokusné fáze III .....</i>	68
<b>Tab. 33</b>	<i>Obsah spermidinu ve vzorcích vína z pokusné fáze III .....</i>	69
<b>Tab. 34</b>	<i>Celkový obsah polyfenolů ve vzorcích vína z pokusné fáze III .....</i>	70
<b>Tab. 35</b>	<i>Celková antioxidační aktivita ve vzorcích vína z pokusné fáze III.....</i>	71



# 1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

## 1.1. Víno a suroviny pro jeho výrobu

Definice hroznového vína vychází z legislativy společné pro Evropská společenství, kdy se vínem rozumí výrobek, který byl získán výhradně úplným nebo částečným alkoholovým kvašením čerstvých, rozdrčených nebo nerozdrčených vinných hroznů nebo hroznového moštu [1].

Hrozny révy vinné (*Vitis vinifera* L.) jsou surovinou pro výrobu přírodních, perlivých, šumivých i dezertních vín, vinných destilátů a také mohou sloužit jako významná konzumní odrůda. Hrozny se skládají z bobulí a třapin, bobule je pak ze slupky, dužiny a semen. Dužina představuje 85 – 90 % hm. hroznů. Látkové složení jednotlivých částí hroznů se značně liší, kromě vody jsou pro výrobu vína nejdůležitější části sušiny: monosacharidy (10 – 30 % hm. v dužině), organické kyseliny (kolem 1 % hm. v třapinách, slupce a dužině), třísloviny (až 2 % hm. ve slupce, až 3 % hm. v třapině, až 5 % hm. v semenech) a barviva (až 15 % hm. ve slupce) [2,3].

## 1.2. Technologie výroby révového vína

Technologie výroby révového vína začíná sklizní na vinohradu, která může být manuální, poloautomatická až zcela automatická. Ihned po sklizni jsou hrozny v čistých přepravních obalech dopraveny pro další zpracování do vinařského závodu. Následující operací je drcení, případně mletí hroznů, což má napomoci lisování. Variací je zde také použití odzrňovacích žlabů, kde dochází k oddělení třapiny. Po drcení by měl vzniknout meziproduct zvaný rmut, ve kterém jsou rozrušeny všechny bobule, avšak semena, slupky, ani případné třapiny rozrušeny nejsou [2-5].

Pro výrobu červených a aromatických bílých vín se rmut nechává zakvášet. Cílem tohoto procesu je u bílých odrůd vyluhování vyšších koncentrací aromatických látek ze slupek. Z modrých hroznů je snaha vyluhovat třísloviny a barviva, které udávají trpkou chuť a barvu červených vín. Doba macerace rmutu je závislá především na surovině a teplotě, při výrobě bílých vín je to až 24 hodin, při výrobě červených vín maximálně 8 dní při teplotě 15 °C [2].

Rmut se následně lisuje. Prvním krokem je zde oddělení samotoku, který tvoří až 40 % moštu. Další podíly moštu jsou získávány účinkem tlaku na rmut, případně hrozny. Pevné oddělené části se nazývají matoliny a tvoří významný odpad při výrobě révového vína. Při lisování se uplatňuje pozvolné a přerušované působení tlaků, které zajišťuje plynulý odtok moštu. Celková vylisnost činí 70 – 75 % hm., což je ovlivněno hlavně kvalitou suroviny [2-5].

Vylisovaný mošt obsahuje zákal, který je způsoben přítomností pevných částic z bobulí hroznů (semena, zbytky slupek a dužiny, případně části třapin). Tyto pevné částice mohou do moštu zanést mikroorganismy, případně rezidua přípravků na ošetření hroznů, což by vedlo ke znehodnocení budoucího vína.

Proto se před dalším zpracováním mošt odkaluje. To je možné provést několika způsoby: dekantačně, kdy se nechá kal usadit na dně k tomu určených nádob, nebo dynamicky, k čemuž se používají odstředivky, vakuové filtry nebo flotační techniky. Teplota moštu při odkalování je ideálně v rozmezí 5 – 10 °C, což zabrání případnému rozkvášení [2,4].

Po odkalení nastává v nejlepším případě kvašení moštu, avšak legislativa dovoluje případné úpravy moštu před hlavním kvašením. Mezi hlavní metody úpravy moštu patří úprava cukernatosti, úprava množství kyselin a síření moštu. Úprava cukernatosti je možná pouze u vín kategorie stolní, zemské, jakostní odrůdové a známkové, přičemž panují odlišné podmínky pro úpravu vín bílých, růžových a červených a úprava je závislá i na oblasti původu vína. Ve vinařské zóně A, což je v ČR vinařská oblast Čechy, lze navýšit cukernatost moštů a rmutů o maximálně 5 °NM, přičemž pro vína stolní a zemská platí, že lze zvýšit cukernatost na maximální hodnoty 19,3 °NM pro víno bílé a růžové a 20,2 °NM pro víno červené. Vína jakostní odrůdová a známková lze upravit (bez ohledu na barvu vína) až na cukernatost 25,2 °NM. Ve vinařské zóně B, kam spadá i vinařská oblast Morava, lze navýšit cukernatost moštů a rmutů maximálně o 3,4 °NM, přičemž u vína stolního a zemského platí, že víno bílé a růžové lze navýšit cukernatost na 20,2 °NM a víno červené na 21,0 °NM. Pro vína jakostní odrůdová a známková platí, že lze zvýšit cukernatost na maximálně 25,2 °NM, bez ohledu na barvu vína. Obsah zkvasitelných cukrů lze zvyšovat sacharózou, případně také zahuštěnými mošty [1].

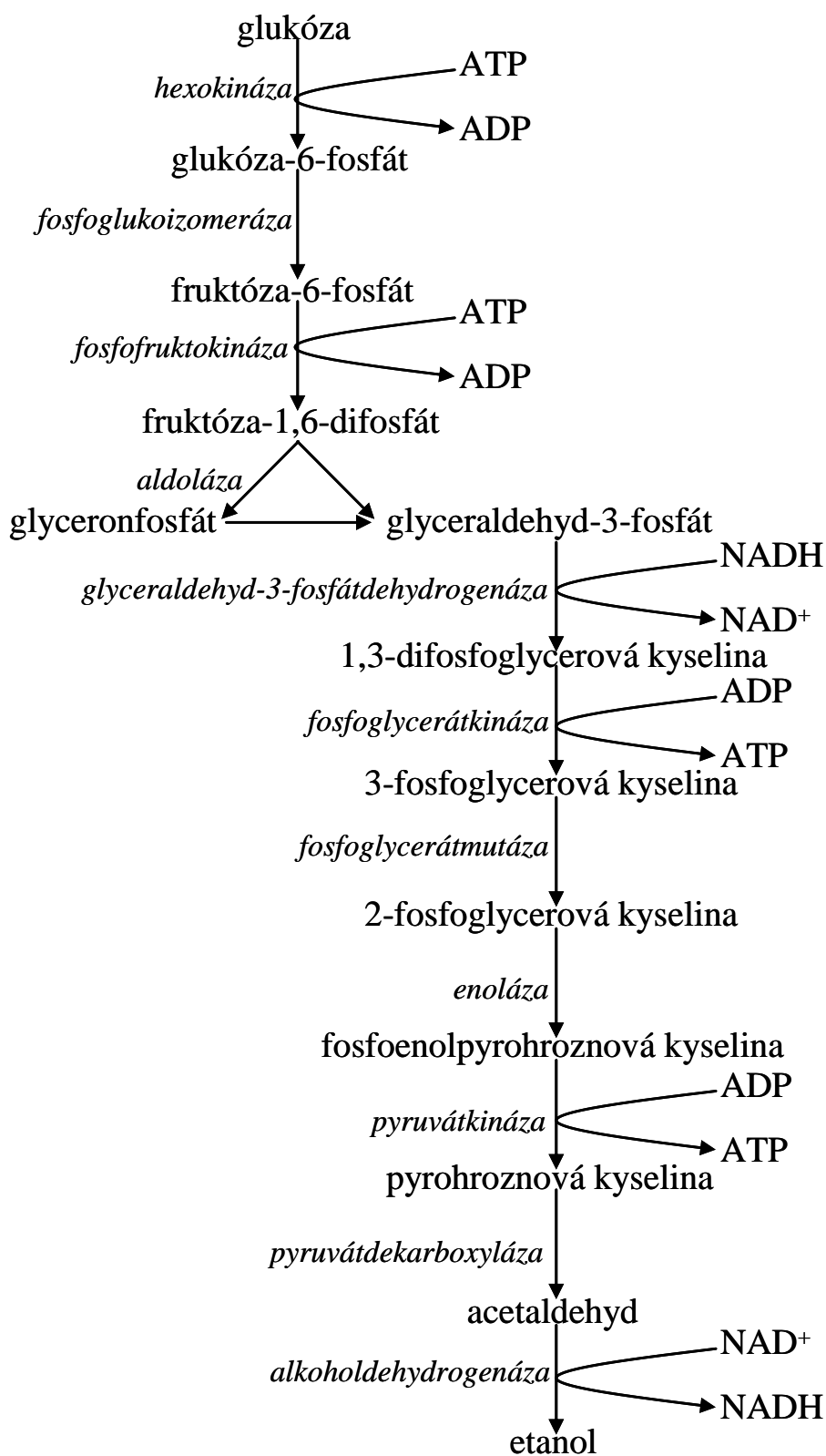
Úprava množství kyselin se používá především tehdy, je-li koncentrace kyselin v hroznech vyšší než 12 g.l<sup>-1</sup>, jedná se pak o odkyselování, při kterém se používá uhličitan vápenatý (CaCO<sub>3</sub>). Ten reaguje s kyselinou vinnou za tvorby krystalického vinanu vápenatého, který se následně od upraveného moštu oddělí například dekantací. Úpravám množství kyselin se zabývá podrobně následující kapitola.

Síření moštu je při výrobě vína mnohdy nezbytným krokem. Pomocí oxidu siřičitého SO<sub>2</sub> se ničí plísně, některé kvasinky a aerobní bakterie, dále chrání mošt před oxidačními změnami, zvyšuje barevnou stabilitu, případně, při použití síření do rmutu, napomáhá SO<sub>2</sub> destruovat buněčnou strukturu bobulí, čímž zvyšuje účinnost přechodu barevných a aromatických látek do moštu. Množství volného i vázaného oxidu siřičitého ve vínech upravuje legislativa [1,2,4,6].

Následujícím procesem výroby révového vína je kvašení moštu. Etanolové kvašení je nejdůležitější proces podílející se na tvorbě vína. Jeho podstatou je přeměna zkvasitelných cukrů obsažených v moštu na etanol a oxid uhličitý pomocí kvasinek. Alkoholové kvašení je souhrnně znázorněno v následující rovnici [4]:



Podrobné schéma přeměny glukózy na etanol je zobrazeno na obr. 1 [2].



**Obr. 1** Podrobné schéma přeměny glukózy na etanol [2]

Základním mikroorganizmem, který se projevuje během kvašení, jsou kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Během kvašení moštu probíhá kromě hlavní reakce také široké spektrum dalších reakcí, které mají za následek produkci značného množství organolepticky aktivních sloučenin. Jedná se především o organické kyseliny, dikarboxylové sloučeniny, estery, vyšší a vícečetné alkoholy aj. [3].

Technologie této operace probíhá buď samovolně (spontánní kvašení) nebo očkovaním kulturními kmeny kvasinek (řízené kvašení). Spontánní kvašení se v moderní velkovýrobě vína nepoužívá, neboť se během fermentace uplatňují tzv. divoké kvasinky, kam patří především *Kloeckera apiculata*, rody *Candida* a *Metschnikowia*. Při řízeném kvašení se do moštu přidává čistá kultura kvasinek, čímž je zabráněno kvašení nežádoucím směrem [2,5-7].

Samotné kvašení je rozděleno do několika fází. V první fázi probíhá adaptace kvasinek na relativně nepříznivé podmínky moštu. Po několika hodinách následuje rozmnožovací fáze, kdy dochází k pučení kvasinek. Poté se jedná o fázi hlavního kvašení, kdy je přeměněno maximální množství zkvasitelného substrátu. Poslední fází je odumírání kvasinek, po které se již obsah monosacharidů nemění [3].

Průběh alkoholového kvašení ovlivňují faktory vnější i vnitřní. Nejdůležitější vnější faktor je teplota. Ta ovlivňuje jak růst kvasinek, tak rychlost produkce etanolu i dalších aromatických sloučenin. Mezi nejdůležitější vnitřní faktory patří množství zkvasitelných cukrů, obsah etanolu, obsah  $\text{SO}_2$  a obsah kyselin. Celková doba kvašení závisí na teplotě kvašení, při teplotách kolem  $25\text{ }^\circ\text{C}$  je to přibližně 6 dní, při  $20\text{ }^\circ\text{C}$  9 dní a při teplotě  $15\text{ }^\circ\text{C}$  činí doba kvašení přibližně 18 dní [2,3,7].

Po hlavním kvašení následuje série zákroků, které se souhrnně označují jako školení vína. Během těchto operací se stabilizují a optimalizují vzhledové a chuťové vlastnosti vína. Základními technologickými operacemi jsou dolévání, stáčení, síření, čiření nebo filtrace vína. Tyto operace mají za úkol oddělit nežádoucí sloučeniny, případně zabránit oxidačním změnám mladého vína. K operacím školení vína náleží také malolaktická fermentace, o té bude pojednáno později v samostatné kapitole [2-4,8].

Poslední operací průmyslové produkce vína je lahvování. Včasné převedení vína do skleněných lahví zajišťuje ideální pokračování procesu zrání. Víno se stává tzv. lahvově zralým. Jako nejlepší ze současných poznatků praxe se jeví uzavírat vína do lahví pomocí korkové zátky, neboť korek je pružný a přes jeho buněčné stěny probíhá neustálá nepatrná výměna vzduchu (mikrooxidace), což přispívá k pomalému zušlechťování vína [2-5,7,8].

### **1.3. Metody úpravy kyselosti při výrobě vína**

Hlavní část této dizertační práce se zabývá úpravou kyselosti vína pomocí malolaktické fermentace. V této kapitole budou postupně popsány i jiné metody úpravy kyselosti, se kterými je možné se setkat při výrobě vína.

Úprava obsahu kyselin a hodnoty pH vína může nastávat v jakékoli fázi výroby; jednak tedy lze upravovat množství kyselin u moštů, jednak u mladého vína. Nicméně úpravy kyselosti po hlavním kvašení jsou považovány za optimální, neboť během kvašení může díky metabolismu kvasinek a bakterií docházet k samovolnému odkyselování vyráběného vína. Zároveň se během kvasného procesu může výrazně měnit struktura kyselin. Z pohledu tématu této práce je významné, že některé kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* produkují značná množství kyseliny L-jablečné. Z výše zmíněného vyplývá, že je praktičtější provádět odkyselování až po hlavním kvašení. S okyselením meziproductů výroby vína je však situace jiná, v některých zemích je totiž okyselení po hlavním kvašení zakázáno. Jestliže je tedy nutné víno okyselit, musí se tento zákrok provádět ještě před hlavním kvašením, jde tedy o okyselení moštů [2-4].

Neexistují přesná doporučení a není možné přesně určit optimální hodnoty kyselosti a pH moštů a vína. Ideální charakteristiky vína jsou příliš proměnné, záleží na stylu, druhu a charakteru vína, výrobci vína i na požadavcích konzumentů. Nicméně, akceptovatelné rozmezí celkového obsahu kyselin v mnohých vínech je 5,5 až 8,5 g/l, přičemž u bílých vín je preferován vyšší obsah kyselin než ve vínech červených. Kyselost je důležitý faktor nejen pro produkci vín čistých a svěžích chutí, ale také podporuje barevnou stabilitu. Z hlediska dlouhodobého je optimální kyselost klíčovým faktorem, který zamezuje předčasnému stárnutí vína a zároveň chrání víno před mikrobiální kontaminací. Podobně je tomu i s určením intervalu hodnot pH, kdy pro bílá vína se uvádí optimální hodnota 3,1 až 3,4, pro červená vína 3,3 až 3,6. Poněkud nižší hodnoty pH jsou obvykle požadovány v mošttech, neboť během hlavního kvašení i po kvašení hodnota pH stoupá, často jako výsledek krystalizace solí kyseliny vinné [2-4].

### 1.3.1. Úprava kyselosti u moštu

**Okyselení** moštu se provádí při jeho nízké kyselosti. Zvýšení kyselosti má pozitivní vliv na údržnost vyráběného vína, neboť se tímto zákrokem omezuje růst kontaminujících mikroorganismů. Zároveň se při nižším pH lépe tvoří aromatické látky, které ve víně vznikají během fermentace [2-4,8].

Jedna z nejstarších procedur úpravy pH a kyselosti je použití síranu vápenatého. Ten může reagovat s hydrogenvinanem draselným za produkce síranu draselného, kyseliny vinné a vinanu vápenatého. Tato forma okyselení způsobuje ztrátu aroma vína, navíc se ve víně zvyšuje koncentrace síry [2-4].

Daleko běžnější forma okyselení je přímým okyselením organickými kyselinami. Typicky je používána kyselina vinná. Ta způsobuje relativně rychlý rozklad mikroorganismů a kromě toho snižuje hodnotu pH vychytáváním volných iontů draslíku za tvorby hydrogenvinanu draselného. Další alternativou je používání kyseliny L-mléčné. Ta nejen zvyšuje kyselou chuť, ale také přispívá k tvorbě plné chuti a aroma vína. Naproti tomu se kyselina citronová

k úpravě kyselosti nepoužívá. Ačkoli by tato kyselina mohla zlepšovat koloidní stabilitu vína (usnadňuje stabilizaci železnatých a železitých iontů, které způsobují zákaly), je citlivá na rozklad pomocí bakterií mléčného kvašení, což může vést k zvýšené produkci diacetylu [2-4].

Okyselování moštu se běžně používá v produkčních oblastech s horkým a teplým podnebím, kvůli intenzivnímu rozkladu kyseliny L-jablečné v konečné fázi dozrávání hroznů révy vinné.

**K odkyselování** moštů dochází jen tehdy, kdy je třeba momentálně změnit hodnotu kyselosti nebo pH.

Odkyselování nadměrně kyselých moštů, s nízkou hodnotou pH, může zahrnovat míchání s moštů o nižší kyselosti a vyšším pH. Další metodou je neutralizace některých kyselin přidáním uhličitanu vápenatého nebo uhličitanu draselného [2-4].

Provozně nejtěžší situace nastává tehdy, pokud má mošt zároveň vysokou kyselost i vysokou hodnotu pH. To nastává především u moštů v regionech s chladným podnebím, ve kterých mohou mít hrozny zároveň vysoký obsah kyseliny L-jablečné a draselných iontů. Pokud nastane taková situace, je postup následující: nejprve se víno okyselí přidáním kyseliny vinné, aby koncentrace kyselin L-jablečné a vinné byly vyrovnané. V dalším kroku je do moštu přidán speciální přípravek pro odkyselování (metoda i speciální přípravek se nazývá ACIDEX), který neutralizuje všechny přítomné kyseliny, tedy i kyselinu L-jablečnou, která se jinak odstraňuje z vína velmi nesnadno. Posledním krokem této metody je opět přidání kyseliny vinné, která reaguje s draselnými ionty, čímž se ustavuje žádoucí hodnota pH i kyselosti [2-4].

Podmíněně použitelnou metodou je odkyselování způsobené ředěním s vodou. Protože se touto metodou snižuje i obsah zkrasitelných cukrů i aromatických a barevných sloučenin, je důležité jejich obsah po zředění doplnit na původní hodnoty. Tato metoda je sice možná, je však v mnohých zemích legislativně zakázána [1].

### **1.3.2. Úprava kyselosti mladého vína po hlavním kvašení**

Jak bylo zmíněno výše, úprava kyselosti po hlavním kvašení zahrnuje pouze odkyselování. Zároveň je technologicky účinnější odkyselování mladého vína než moštu, neboť se během hlavního kvašení mění obsah kyselin i jejich poměr. Víno může být odkyseleno několika fyzikálně-chemickými nebo biologickými způsoby.

**Fyzikálně-chemické způsoby** odkyselování zahrnuje další odstraňování kyselin neutralizací (srážení), případně je možné použít moderní metody separace kyselin na koloně.

Srážení znamená většinou neutralizaci kyseliny vinné; kyselina L-jablečná se do srážecích procesů nezapojuje, neboť její soli jsou lépe rozpustné ve vodě. Odstranění vzniklé sráženiny se děje při stáčení vína, filtraci nebo odstředěním a toto oddělení vzniklých solí činí odkyselení nevratným.

Separace kyselin na koloně je metoda iontové výměny a zahrnuje přechod vína přes kolonu obsahující pryskyřice. Během průchodu vína kolonou dochází k přechodu iontů mezi vínem a náplní kolony a typem náplně lze ovlivňovat separovanou kyselinu. Ionty vinanové se často zaměňují za ionty hydroxylové  $\text{OH}^-$ , čímž dochází k snížení koncentrace vinanů ve víně. Hydroxylové ionty uvolněné z pryskyřic reagují s vodíkovými ionty za vzniku vody. Jinou metodou je odstraňování jablečnanů, které mohou být z vína odstraněny pomocí pryskyřic obsahující vinanové ionty. Následný přebytek vinanů ve víně může být snížen srážením. Hlavní limitující faktor separace kyselin na koloně, kromě právních omezení a ceny, je tendence k odstranění aromatických a barevných látek z vína, čímž se snižuje kvalita vína [2-4].

**Biologické odkyselování** pomocí malolaktické fermentace je pravděpodobně nejpoužívanější prostředek úpravy kyselosti vína. Jako samostatný proces může probíhat před, během i po hlavním kvašení. Podrobně se tomuto procesu bude věnovat následující kapitola [2-4].

#### 1.4. Malolaktická fermentace

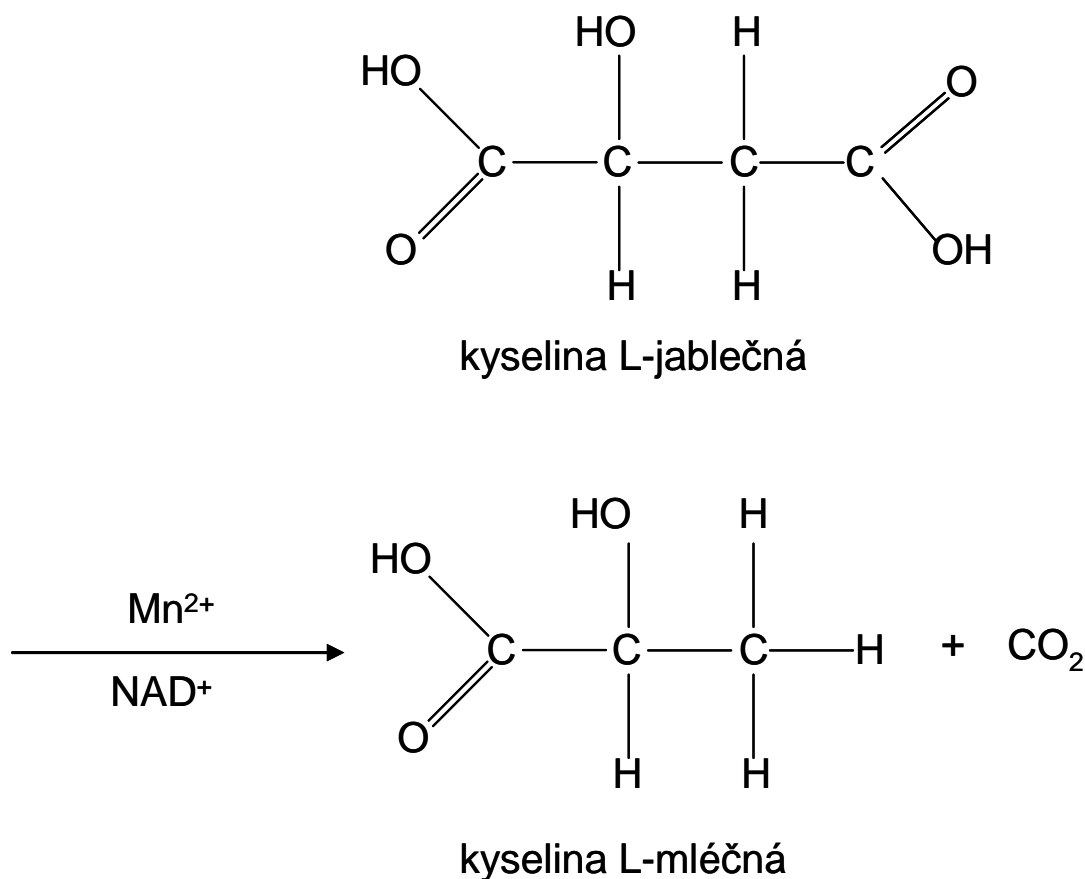
Malolaktická fermentace (dále jen MLF) je významný krok výroby téměř všech červených a velkého množství bílých vín. Přestože název operace v sobě nese slovo fermentace, nejedná se ve skutečnosti o správný výraz. Podstatou MLF je přeměna kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou činností bakterií mléčného kvašení, což je proces dekarboxylační. Dekarboxylace kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou je katalyzována malolaktickým enzymem. Ten byl prvně zjištěn u bakterie *Lactobacillus plantarum*. Vzhledem k povaze MLF není tato reakce jedinou, která zde probíhá, je však určitě dominantní, a proto nejvíce ovlivňuje charakter produkovaného vína. Schematický průběh této reakce je zobrazen na obr. 2 [2,3,8-11].

MLF probíhá ve víně ideálně ihned po ukončení hlavního kvašení, případně také v moštu před propuknutím alkoholového kvašení. A podobně jako etanolové kvašení může probíhat MLF spontánně nebo řízeně. K spontánnímu kvašení dochází díky přítomnosti mléčných bakterií na hroznech nebo ve vinařském provozu. Mezi mikroorganismy podílející se na tomto kvašení patří převážně druhy *Lactobacillus* spp. (*L. plantarum*, *L. cellobiosis*, *L. brevis*, *L. büchneri*, *L. hilgardii*), *Pediococcus* spp. (*P. parvulus*, *P. cerevisiae*, *P. pentosaceus*) a *Leuconostoc* [2,3].

Pro správný průběh MLF je vhodnější použít čisté kultury mléčných bakterií vyselektovaných pro tyto účely. Tyto preparáty, při dodržení předepsaných vnitřních i vnějších faktorů, zajistí správný průběh biologického odbourání kyseliny L-jablečné. Nejčastěji využívaný druh bakterií, které také dle výzkumů mají nejlepší výsledky při posuzování MLF, je heterofermentativní druh *Oenococcus oeni* (dříve *Leuconostoc oenos*) [8-12].

Správný průběh MLF ovlivňuje několik faktorů. Mezi významné vnější faktory patří opět teplota, nejdůležitější vnitřní faktory jsou hodnota pH a obsah  $\text{SO}_2$ .

Vliv teploty na MLF je znám již velmi dlouho. Maximálního efektu je dosaženo při teplotách mezi 20 až 25 °C. Při nižších teplotách klesá rychlost průběhu MLF značným způsobem, při teplotě 10 °C ustává. Teploty nad 25 °C sice zrychlují množení *O. oeni*, ale zároveň dochází ke zvyšování aktivity divokých druhů bakterií mléčného kvašení, což může vést až ke zvrhnutí vína [2,3,8-12].



**Obr. 2** Schéma hlavní reakce malolaktické fermentace [2]

Hodnota pH je další ze zásadních faktorů MLF. Nízké hodnoty pH působí na víno konzervačním účinkem, takže nedochází k rozvoji a růstu bakterií mléčného kvašení. Optimální pH leží v rozmezí hodnot 3,0 – 3,6. Pokud je pH nižší, je nutno před očkovaním provést odkyselování vína, například pomocí uhličitanu vápenatého ( $\text{CaCO}_3$ ) [8,11].

Dalším významným faktorem je obsah oxidu siřičitého ( $\text{SO}_2$ ). Tato látka velmi účinně eliminuje populace bakterií mléčného kvašení, což může průběh MLF zcela vyloučit. Pro bezproblémový průběh MLF jsou uváděny maximální hodnoty pro volný  $\text{SO}_2$  15  $\text{mg.l}^{-1}$  (ideálně žádný) a obsah celkového  $\text{SO}_2$  45  $\text{mg.l}^{-1}$  [3].

MLF má na víno a jeho organoleptické vlastnosti velmi zásadní vliv. Díky dominantní reakci se snižuje celková kyselost vína, což má za následek zmírnění kyselé chuti. Zároveň je silná nevyzrálá chuť kyseliny L-jablečné zaměněna za



méně výraznou chuť kyseliny L-mléčné. Avšak další reakce, které doprovázejí MLF, se projevují na dalších jemných změnách vína. Pokud je MLF provedena u vín, u kterých je ovocný charakter aroma méně podstatný, tak většinou vede také ke zlepšení chuti a vůně. Naopak vína vyznačující se výrazným hroznovým aroma jsou pro MLF méně vhodná, neboť jejich aroma po MLF slábne [12].

Biochemické změny při MLF nejsou ještě zdaleka všechny prozkoumány. Mnohé vyprodukované sloučeniny mohou ovlivňovat jakost i zdravotní nezávadnost vína. V literatuře se objevují některé sloučeniny, jejichž koncentrace se působením MLF mění. Jedná se především o další organické kyseliny (vyjma kyseliny L-jablečné a L-mléčné), dikarboxylové sloučeniny, biogenní aminy a látky antioxidační povahy [8-17].

## 1.5. Bakterie mléčného kvašení ve víně

Mléčná fermentace je bakteriální proces, který zaujímá význačné postavení při výrobě mnoha druhů potravin. Produkty mléčného kvašení dodávají produktům charakteristické aroma a texturu a také jsou nezastupitelné při konzervaci potravin. Bakterie způsobující mléčné kvašení se označují jako bakterie mléčného kvašení (BMK). Ty vykazují značnou morfológickou i fyziologickou rozmanitost. Termín bakterie mléčného kvašení se objevil na počátku 20. století a zahrnuje velmi heterogenní skupinu bakterií, které jsou v současnosti definovány jako kulovité nebo tyčinkovité, grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující, anaerobní nebo aerotolerantní producenti kyseliny L-mléčné [3].

Přítomnost BMK ve víně poprvé prokázal již Louis Pasteur. O několik let později, stále však ještě v 19. století, dokázali Müller-Thurgau a Koch vliv BMK na odkyselování vína. Na začátku 20. století popsal Seifert schopnost BMK rozkládat kyselinu L-jablečnou [3].

Jen několik druhů BMK je schopno růstu v hroznovém moštu a víně, neboť prostředí těchto nápojů je pro BMK velmi nepříznivé. Limitující faktory jsou především nízké hodnoty pH, nedostatek živin a přítomnost etanolu. Hlavní druhy BMK schopných přežít v tomto prostředí znázorňuje tabulka 1. V tabulce nejsou zahrnuty BMK, které byly nalezeny na hroznech nebo meziproduktech výroby vína teprve v nedávné době. Jedná se zejména o BMK identifikované v moštích (*Lactobacillus bobalius* a *Lactobacillus uvarum*) a vínech (*Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus vini* a *Lactobacillus oeni*) [18-22].

Druh *Leuconostoc oenos* byl považován až do roku 1995 za část rodu *Leuconostoc*, kdy bylo analýzou ribozomální DNA dokázáno, že se nejedná o stejný rod. To vedlo k vytvoření nového rodu *Oenococcus*, který zahrnuje dva druhy, z nichž pouze druh *Oenococcus oeni* metabolizuje kyselinu L-jablečnou na kyselinu L-mléčnou. Zároveň je tento druh výjimečný tím, že z druhů metabolizujících kyselinu L-jablečnou má nejlepší schopnosti růstu v podmínkách kyselého prostředí a přítomnosti 10 % obj. etanolu [3,18-22].

**Tab. 1** Bakterie mléčného kvašení ve víně [3]

Rod	Metabolizmus cukrů	Druh
<i>Pediococcus</i>	Homofermentativní	<i>P. damnosus</i> <i>P. cerevisiae</i> <i>P. parvulus</i> <i>P. pentosaceus</i>
<i>Leuconostoc</i>	Heterofermentativní	<i>Leu. Mesenteroides</i>
<i>Oenococcus</i>	Heterofermentativní	<i>O. oeni</i>
<i>Lactobacillus</i>	Homofermentativní Fakultativně heterofermentativní Heterofermentativní	<i>L. mali</i> <i>L. casei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. cellobiosis</i> <i>L. brevis</i> <i>L. büchneri</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. fructivorans</i> <i>L. hilgardii</i>

### 1.5.1. Metabolizmus BMK ve víně

I když má degradace kyselin L-jablečné a citronové pomocí BMK největší vliv na konečnou jakost vína, metabolizují tyto bakterie, k zajištění svého růstu a množení, i jiné substráty. Za zmínku stojí především metabolizmus zkvasitelných cukrů, organických kyselin, fenolových sloučenin a aminokyselin.

#### Metabolizmus sacharidů

V hroznech révy vinné a tím i v mošttech jsou nejvíce zastoupenými sacharidy glukóza a fruktóza. Disacharidy (maltóza, rafinóza a trehalóza) a oligosacharidy jsou zastoupeny v nižších koncentracích [23]. Bylo dokázáno, že BMK ve víně metabolizují sacharidy, používají je jako zdroj uhlíku a energie [24].

Polysacharidy mohou mít na víno škodlivý efekt, nejen že zvyšují viskozitu (což je třeba vyvážit korekcemi podmínek filtrace), ale také mění organoleptické vlastnosti vína (konzistence, kruhovitost, plnost chuti). Již dříve byl studován vliv bakterií *O. oeni* na rozklad polysacharidů během MLF. Bylo dokázáno, že tyto bakterie produkují ve stacionární fázi růstu extracelulární enzym  $\beta$  - (1-3) glukánázu, čímž mohou štěpit polysacharidy glukanového typu. Tím se může zvyšovat u vína po MLF koncentrace glukózy a fruktózy [25].

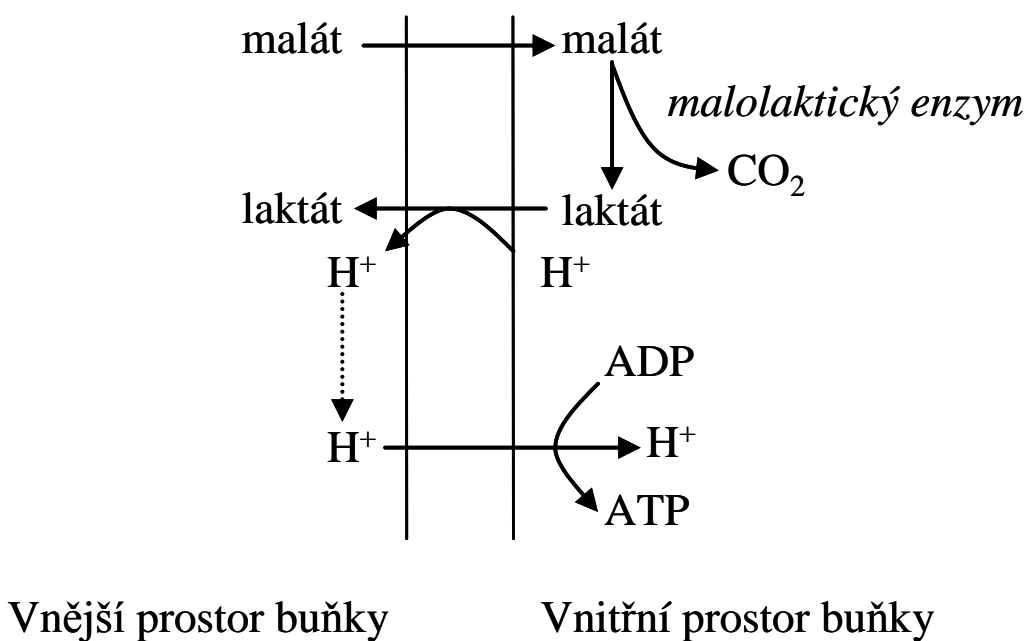
#### Metabolizmus organických kyselin

BMK jsou schopné metabolizovat hlavní organické kyseliny přítomné v moštu i ve víně. Nejznámější je rozklad kyselin L-jablečné a citronové, může ale také nastat rozklad kyseliny vinné. Kyselinu citronovou mohou fermentovat BMK

pouze za spotřebování hexózy, kdežto kyseliny L-jablečná a vinná mohou být fermentovány samostatně [3].

### Metabolizmus kyseliny L-jablečné

Kyselina L-jablečná je jedna ze dvou hlavních kyselin přítomných ve víně. Její metabolismus probíhá jako rozklad dikarboxylové kyseliny L-jablečné na monokarboxylovou kyselinu L-mléčnou a oxid uhličitý, jak je popsáno v předchozí kapitole. Tímto krokem se ve víně zvyšuje hodnota pH a mění se také sensorický profil vína. Reakce přeměny je přímá, tím je míněno, že se během této přeměny netvoří meziprodukty. Za tuto přeměnu odpovídá malolaktický enzym, poprvé separovaný a určený v čisté podobě z bakterie *Lactobacillus plantarum* [3]. Tento enzym byl zatím prokázán u všech BMK, které se vyskytují ve víně. Enzym je dimer, formovaný dvěma identickými podjednotkami o velikosti 60 kDa. Katalyzuje redoxní reakci zahrnující přeměnu  $\text{NAD}^+$  na  $\text{NADH}_2$ . Obrázek 3 ukazuje mechanismus základních přeměn a produkci energie během MLF [3].



**Obr. 3** Mechanismus přeměn probíhajících při metabolické přeměně kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou u BMK pomocí malolaktického enzymu [3]

### Metabolizmus kyseliny citronové

Kyselina citronová je přítomna v hroznech, mošttech i hroznovém víně v nižších koncentracích ( $0,1 - 1 \text{ g.l}^{-1}$ ) než hlavní organické kyseliny kyselina vinná ( $2 - 8 \text{ g.l}^{-1}$ ) a kyselina L-jablečná ( $1 - 7 \text{ g.l}^{-1}$ ). BMK ve víně jsou schopny metabolizovat kyselinu citronovou, jak bylo prokázáno pomocí metody NMR spektroskopie se značenými izotopy. BMK, včetně *O. oeni*, nevyužívají kyselinu citronovou jako zdroj uhlíku, ale metabolizují ji společně s glukózou (hexózou). Bylo prokázáno, že bakteriální biomasa roste lépe v přítomnosti kyseliny

citronové a glukózy než jen v přítomnosti glukózy. Po transportu kyseliny citronové do buňky je přeměněna na směs kyselin mléčné a octové, diacetylu, acetoinu a 2,3-butandiolu [26].

#### Metabolismus kyseliny vinné

Některé druhy BMK (zejména rodu *Lactobacillus*) jsou schopné rozkládat kyselinu vinnou, ačkoli tato schopnost je mnohem slabší než schopnost metabolizovat kyseliny L-jablečnou a citronovou. Kyselina vinná je rozkládána pouze po rozkladu ostatních organických kyselin. Katabolismus této kyseliny zmenšuje kyselost vína a přispívá k produkci těkavých kyselin. Zvýšení obsahu těkavých kyselin rozkladem kyseliny vinné bylo popsáno již Louistem Pasteurem. Tento děj nejčastěji postihuje vína vyráběná v teplých oblastech, která mají hodnotu pH vyšší než 3,5 a zároveň nízký obsah oxidu siřičitého. To všechno jsou faktory pro rozvoj a růst bakterií rodu *Lactobacillus* [3].

#### **Metabolismus fenolových sloučenin**

Fenolové sloučeniny jsou enormně důležité látky, které přímo i nepřímo ovlivňují kvalitu finálního produktu, vína. Jsou odpovědné nejenom za barvu a trpkost, ale také mohou mít významné nutriční a farmakologické vlastnosti [27]. U bakterií druhu *O. oeni* povzbuzuje a urychluje přítomnost katechinu nebo quercetinu průběh MLF, zatímco při vyšších koncentracích kyseliny *p*-kumarové je rychlost MLF inhibována [28]. Kyselina gallová zastavuje či inhibuje produkci kyseliny octové, což znamená, že je dosažena lepší kontrola MLF a je zajištěna prevence vzniku vyššího množství těkavých kyselin. Na druhou stranu, u *O. oeni* bylo demonstrováno, že fenolové sloučeniny snižují spotřebu cukrů a zvyšují spotřebu kyseliny citronové, což může naopak vést ke zvýšení koncentrace kyseliny octové ve víně [3].

Některé fenolové kyseliny, například kyselina ferulová a *p*-kumarová, se vyskytují přirozeně jak v mošttech tak hroznech révy vinné. Bylo prokázáno, že mohou být dekarboxylovány mnoha BMK, například *L. brevis*, *L. plantarum* a bakteriemi rodu *Pediococcus* [3].

#### **Metabolismus aminokyselin**

Aminokyseliny mohou být metabolizovány tehdy, pokud může probíhat jejich dekarboxylace, transaminace a deaminace. Dekarboxylace aminokyselin vede k produkci oxidu uhličitého a biogenních aminů. Mnoho studií analyzovalo metabolismus aminokyselin pomocí BMK ve víně, především pak argininu, histidinu, ornitinu a tyrosinu. Produkty jejich metabolismu (alkoholy, aldehydy a biogenní aminy) mají zásadní vliv na kvalitu a zdravotní nezávadnost vína [3].

### **1.6. Markery kvality révového vína**

Hodnotit kvalitu produktů potravinářského průmyslu je vždy složité. Spoléhat se čistě na senzorickou analýzu může být zavádějící. Tato analýza je sice ošetřena

mnoha postupy při výběru hodnotitelů i podmínek samotného hodnocení, přesto její výsledky mohou být výrazně subjektivní. Zároveň jsou z ní zcela vyloučeny takové markery, které nemají výrazné organoleptické vlastnosti. Ideálním markerem je taková sloučenina, kterou lze snadno objektivně stanovit, a zároveň je její obsah v přímé souvislosti s kvalitou produktu [2].

Mezi potencionální markery kvality hroznového vína, v souvislosti s aplikací řízeného odbourávání kyseliny L-jablečné, patří organické kyseliny, dikarboxylové sloučeniny, biogenní aminy a látky vykazující antioxidační aktivitu [8-17]. V následujícím textu budou tyto látky postupně popsány.

### **1.6.1. Organické kyseliny**

Organické kyseliny vnikají asimilací v zelených částech rostlin z vody a oxidu uhličitého. Jejich přesnější označení dle chemického názvosloví je karboxylové kyseliny, ve svých molekulách obsahují jednu či více karboxylových skupin. Podle počtu těchto skupin jsou děleny na monokarboxylové a polykarboxylové, dále jsou děleny podle charakteru uhlovodíkového zbytku na alifatické nebo cyklické a na nasycené, nenasycené nebo aromatické [29].

Karboxylové kyseliny jsou významnou složkou metabolitů, i v malé koncentraci významně mění organoleptické a technologické vlastnosti výrobku. Kromě toho spoluurčují hodnotu pH potraviny, čímž ovlivňují průběh chemických reakcí a mikrobiologickou stabilitu potravin [2,3].

Organické kyseliny se projevují především v ovoci a ovocným produktům dodávají typickou chuť. Příjemnou chuť a vůni ovoci dávají také estery karboxylových kyselin [29].

Obsah kyselin ve víně je ovlivněn mnoha faktory: odrůdou, stupněm zralosti, agrotechnickými podmínkami vinohradu i klimatickými faktory. Nejvíce jsou v hroznovém víně zastoupeny kyselina vinná a L-jablečná. U vín z dobrých ročníků, kdy jsou všechny faktory příznivé pro produkci kvalitního révového vína, převládá kyselina vinná a naopak v nevyzrálých ročnících převažuje kyselina L-jablečná, neboť během vyzrávání vzniká nejdříve. V menší míře se v révovém víně vyskytují další kyseliny, především citronová, jantarová, mléčná a případně octová [29-35].

Kyselina jablečná (hydroxybutandionová) patří mezi dikarboxylové alifatické hydroxykyseliny. Její levotočivá forma je nejrozšířenější kyselinou vyskytující se v ovoci. V nezralých hroznech je její obsah vysoký, ale během procesu dozrávání se odbourává značnou rychlostí. Její konečné množství v hroznech je dáno především klimatickými podmínkami během konečné fáze dozrávání na vinohradech [2].

Kyselina L-jablečná může vytvářet až polovinu kyselosti vína. I při vysokých koncentracích je zdravotně nezávadná, ale má čistě kyselou chuť [29-35].

Kyselina L-jablečná vstupuje jako substrát do základní reakce MLF. Stanovení obsahu této kyseliny poskytne výrobcí velmi přesnou informaci o průběhu technologického procesu.

Kyselina mléčná (2-hydroxypropanová) náleží mezi monokarboxylové alifatické hydroxykyseliny. Vyskytuje se ve dvou stereoizomerech, D a L. V potravinářství má velmi výrazné uplatnění, využívá se v masném průmyslu, v pekařství, pivovarnictví, konzervárenství [2,3].

Ve víně se může vyskytovat v obou svých stereoizomerních formách. V malém množství vzniká činností kvasinek, v daleko vyšších koncentracích pak činností BMK. Činností kulturních kmenů bakterií mléčného kvašení určených pro MLF vzniká jako dominantní kyselina L-mléčná. Činností kvasinek a divokých mléčných bakterií vzniká ekvivalentní množství kyseliny D- a L-mléčné [3,31-35].

Kyselina L-mléčná je přímým produktem základní reakce MLF. Je proto, stejně jako kyselina L-jablečná, vhodným nástrojem, kterým lze sledovat průběh malolaktické fermentace.

Kyselina vinná (2,3-dihydroxybutandiová) patří mezi alifatické hydroxykyseliny. Díky dvěma hydroxylovým skupinám na pozici C2 a C3 má dva chirální uhlíky. Vzhledem ke stejným substituentům na obou těchto uhlících existují 2 opticky aktivní formy, kyseliny L-vinná a D-vinná a 2 inaktivní formy, kyseliny mesovinná a hroznová. V ovoci se nejčastěji vyskytuje kyselina L-vinná [2,29].

Kyselina L-vinná se tvoří a ukládá do bobulí během procesu růstu. Ve fázi zrání nedochází k jejímu odbourávání, proto během dozrávání její koncentrace relativně roste (vzhledem k jiným kyselinám). Je dobře rozpustná ve vodě i etanolu, proto snadno přechází do moštu a následně do vína. V přítomnosti draselných iontů vytváří velmi špatně rozpustný hydrogenvinan draselný, který je znám jako vinný kámen [4].

Kyselina L-vinná je spolu s kyselinou L-jablečnou nejdůležitější kyselina ve víně (co se obsahu týká). Nepodléhá sice tak snadno oxidaci jako kyselina L-jablečná, přesto může být metabolizována některými mikroorganismy. I proto byl jedním ze sledovaných faktorů při MLF obsah této kyseliny, zda byla také metabolizována.

Kyselina citronová (2-hydroxypropan-1,2,3-trikarboxylová) patří mezi alifatické hydroxykyseliny. Je hojně rozšířena v ovoci, zejména v citrusových plodech, odkud pochází její název. Tato kyselina je opticky inaktivní [3].

Kyselina citronová má v potravinářství velké využití jako konzervační a aromatický prostředek. Průmyslově se získává buď biotechnologicky pomocí plísně *Aspergillus niger* ze sacharidických substrátů (např. melasa), případně se těží ze šťávy z citrusových plodů [3]. V hroznech a moštu se nalézá kyselina citronová v nízkých koncentracích. Její koncentrace se zvyšuje, pokud dochází ke snižování vlhkosti v surovině, tedy při výrobě speciálních vín (ledové, slámové nebo víno z botrytického sběru) [2,31,32].

V souvislosti s MLF je kyselina citronová poměrně důležitou sloučeninou, neboť po vyčerpání kyseliny L-jablečné se stává společně s monosacharidy

glukózou a fruktózou substrátem pro BMK. Jeden z možných produktů této kyseliny je 2,3-butandion (diacetyl), který má máselné aroma [33,35].

Kyselina jantarová (butandiová) náleží k alifatickým dikarboxylovým kyselinám. Chuťově se projevuje sdruženým vjemem kyselosti, hořkosti a slanosti [2,4].

Kyselina jantarová je v hroznech obsažena ve velmi malém množství. Během procesu výroby vína však může vznikat jako vedlejší produkt etanolového kvašení, případně jako produkt při odbourávání kyseliny L-jablečné činností kvasinek [2,30].

Kyselina octová (etanová) náleží mezi alifatické monokarboxylové kyseliny. Je to důležitý meziprodukt i produkt látkové výměny, patří mezi nejběžnější karboxylové kyseliny v potravinách. Vyskytuje se všude tam, kde dochází k činnosti mikroorganismů, ale vzniká také při termických procesech [2,3].

Zředěná kyselina octová má v potravinářství velmi široké uplatnění. Průmyslově se vyrábí z etanolových substrátů (kvasný líc, pivo, víno) činností mikroorganismů, nejčastěji bakteriemi rodu *Acetobacter* [4].

Kyselina octová se projevuje značnou kyselostí, z toho důvodu je její přítomnost ve víně nežádoucí. Zároveň může sloužit jako marker zdravotního stavu vína, kdy její přítomnost ukazuje na činnost bakterií octového kvašení. Přirozeně se ve víně tvoří při biologickém odbourávání kyseliny vinné. Její obsah nesmí v hotových vínech přesáhnout  $0,6 \text{ g.l}^{-1}$  u bílých vín a  $0,8 \text{ g.l}^{-1}$  u červených vín [2].

Možností, jak stanovit kvantitativní i kvalitativní zastoupení organických kyselin ve víně, je velké množství. Jako celek je lze stanovit titračně. Tato hodnota je velmi důležitá pro vinaře, neboť pokud chce víno nabízet k prodeji, musí tuto hodnotu uvádět na etiketě. Stejně důležitým stanovením je množství těkavých kyselin. Dominantní těkavou kyselinou je kyselina octová. Tato hodnota může výrobcí napovědět, jaký je zdravotní stav vyráběného vína. Obě tyto metody jsou jednoduché, z hlediska instrumentace i provedení, ale výsledky jsou pouhým shrnutím celkových množství [29,35].

Pro stanovení jednotlivých organických kyselin je potřeba použít složitější separační metody. V literatuře se ke stanovení jednotlivých kyselin používají nejčastěji metody vysoce-účinné kapalinové chromatografie s různými typy detektorů, a metody elektromigrační, také s použitím různých typů detektorů [29,35].

### 1.6.2. Biogenní aminy

Biogenní aminy (dále jen BA) jsou dusíkaté organické sloučeniny. V živých systémech mají na buněčné úrovni, při nízkých koncentracích, podstatné metabolické funkce: účastní se procesů růstu a dělení buněk, replikace DNA, specializace buněk, spolukontrolují funkci nervového systému. Naopak při vyšších koncentracích působí pro člověka toxicky: způsobují bolesti hlavy, dýchací potíže, alergické reakce nebo významné snížení krevního tlaku. Jejich fyziologický účinek závisí na jejich příjmu, stejně jako na schopnosti organismu

se vyrovnat s příjmem těchto látek. Odbourávání BA probíhá ve střevní sliznici pomocí enzymů monoaminoxidázy a diaminoxidázy. Tyto enzymy mohou být tlumeny inhibitory, kterými jsou např. některé medikamenty nebo etanol [36-45].

BA jsou vytvářeny v potravinách různými cestami: dekarboxylací aminokyselin, aminací aldehydů a ketonů, případně odbouráváním jiných organických sloučenin obsahujících dusík. Vzhledem k tomu, že víno je fermentovaná potravina, jsou primárním zdrojem výskytu BA ve víně produkty metabolismu mikroorganismů. Aplikace biologického odbourávání kyseliny L-jablečné tedy potencionálně vede k výskytu těchto látek v réвовém víně, což také potvrzují nejroznější literární zdroje [36-57].

V následujícím textu budou stručně popsány vybrané BA, které budou dále studovány: histamin, tyramin, putrescin spermidin, spermin, kadaverin, agmatin. Histamin je BA odvozený od aminokyseliny histidinu. V organismu se uplatňuje jako zprostředkovatel procesů souvisejících se zánětem a také účinná látka uvolňovaná z mastocytů při alergické reakci. Uplatňuje se také jako neurotransmitter v mozku [36-41].

Tyramin je BA vznikající dekarboxylací tyrozinu. V organismu stimuluje uvolňování adrenalinu, noradrenalinu a dopaminu, takže nepřímo způsobuje fyziologické působení těchto látek: vazokonstrikci, zvýšení krevního tlaku a tepové frekvence [41,46].

Putrescin, spermidin, spermin, kadaverin i agmatin patří mezi polyamidy. Prekurzorem putrescinu je aminokyselina ornitin, pro kadaverin je to aminokyselina lyzin. Spermin, spermidin a agmatin jsou odvozeny společně z argininu. Na buněčné úrovni se podílejí na mnoha procesech: putrescin spolu se sperminem a spermidinem se účastní syntézy nukleových kyselin a proteinů, spermin a spermidin se podílejí na obnově střevní tkáně. Agmatin má funkci neurotransmiteru. Putrescin a kadaverin zvyšují toxické působení histaminu, což značně zvyšuje nebezpečí otravy [46,57].

### **1.6.3. Dikarbonylové sloučeniny**

Dikarbonylové sloučeniny (dále jen DS) jsou organické látky, které ve své molekule obsahují dvě karbonylové skupiny. Hlavní DS nalézající se v hroznovém víně jsou glyoxal, metylglyoxal, diacetyl a pentan-2,3-dion. Vyskytují se ve všech typech vína, ale jsou spojovány především s červenými víny a víny z botrytických sběrů [58-66].

DS hrají díky svým vlastnostem důležitou roli v enologii: ovlivňují organoleptické vlastnosti, mohou reagovat s jinými složkami vína a existuje mnoho otázek o vlivu těchto látek na mikroorganismy. Zcela nejdůležitější je však jejich vliv na aroma vína, kdy především diacetyl, a také v mnohem menší míře pentan-2,3-dion, jsou nositeli máslového aroma. Glyoxal a metylglyoxal nemají tak výrazné mléčné či máselné aroma, ale jsou faktory buněčného dělení, účastní se procesů stárnutí buněk a jsou faktory rezistence buněk vůči některým



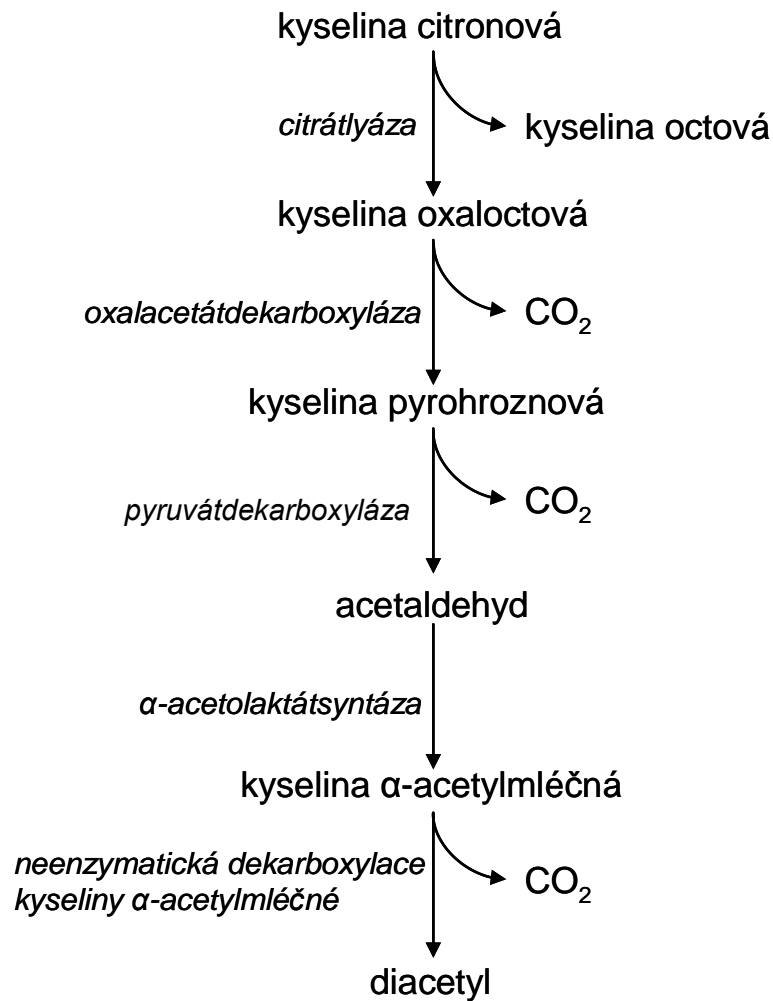
toxickým látkám a farmakům. Zároveň některé studie připisují těmto látkám imunosupresivní vlastnosti i faktory vzniku diabetu [58,75].

Všechny popsané DS, kromě pentan-2,3-dionu, jsou syntetizovány mikroorganismy přítomnými při výrobě vína. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je produkuje během alkoholového kvašení, stejně jako je produkuje bakterie *Oenococcus oeni* během MLF [12].

Diacetyl, systematickým názvem 2,3-butandion, je jednoduchá dikarboxylová sloučenina, konkrétně se jedná o diketon. Za normálních podmínek je to žlutá kapalina s ostrým máslovým aroma. Jeho výskyt v potravinách je spojován s fermentačními procesy, typický je především pro fermentované mléčné výrobky. Může se vyskytovat také v pivu, kde je významnou nežádoucí sloučeninou. Pro svou chuť je však také do potravin přidáván, jedná se především o margariny a popcorn [12,58,67].

Ve víně vzniká jako meziprodukt rozkladu kyseliny citronové účinkem mikroorganismů. Metabolická dráha tohoto rozkladu je znázorněna na obr. 4. Množství vznikajícího diacetylu je silně ovlivněno mnoha faktory, mezi které patří množství kyseliny citronové, kmen použitých bakterií, dávka inokula, druh vína, kontakt vína s kyslíkem a další [2,12].

Stanovení dikarboxylových sloučenin je možné různými metodami: kolorimetricky, chromatograficky s různými typy detekce a za použití nejrůznějších metod extrakce a detekce. Kolorimetrické metody jsou však v tomto případě neselektivní, proto je jejich použití spíše orientační. U chromatografických metod převládá použití plynové chromatografie s hmotnostním, elektrochemickým nebo plamenně-ionizačním detektorem. V literatuře se však také objevují metody vysoce-účinné kapalinové chromatografie a iontově-výměnné chromatografie [58-75].



*Obr. 4 Podrobné schéma přeměny kyseliny citronové na diacetyl [2]*

#### 1.6.4. Antioxidanty

V rostlinách je obsaženo široké spektrum látek, které vykazují antioxidační vlastnosti. Ze složek běžné stravy jsou na ně relativně bohaté obiloviny, čerstvé ovoce a zelenina a nápoje z nich vyrobené. Mezi přirozeně se vyskytujícími antioxidanty patří některé vitaminy, minerální látky, rostlinná barviva, fenolické látky a mnoho dalších skupin. Z chemické podstaty je tato skupina látek nejednotná, liší se proto také podstata jejich antioxidačního působení. Může se jednat např. o přerušení radikálové řetězové reakce, regenerace jiných antioxidantů, komplexní vazba katalyticky působících kovů nebo přímá reakce s kyslíkem. Jako takové hrají antioxidanty důležitou roli proti stárnutí na buněčné úrovni, proti akumulaci LDL frakcí v cévních stěnách nebo působí proti lámavosti cévních stěn [76-81].

Antioxidanty přítomné ve víně jsou zastoupeny mnoha různými sloučeninami. Jsou zde přítomny především nejrůznější fenolické látky, obzvláště flavanoly, stilbeny, jejichž nejvýznamnějším zástupcem je resveratrol, a pak také fenolové

kyseliny, deriváty kyseliny hydroxyskořicové a benzoové. Jejich vysoký obsah je spojován s jevem, který se označuje jako "Francouzský paradox" [76-82].

Flavonoidy tvoří velmi širokou skupinu sekundárních rostlinných látek. V odborné literatuře se objevuje, že v přírodě existuje více než 13 000 látek, které lze považovat za flavonoidy. Tyto látky jsou odvozeny od heterocyklické sloučeniny flavanu, kdy mohou být všechny kruhy substituovány hydroxylovými nebo metoxylovými skupinami, případně se mohou vyskytovat jako glykosidy. Nejběžnější flavonoidy ve víně jsou katechin (flavan-3-ol) a jeho deriváty a také antokyanidiny, které jsou známé svou barevností na základě rozdílného pH.

Ze skupiny látek označovaných jako flavan-3-oly se v révovém víně nejvíce vyskytuje (+)-katechin a jeho izomer (-)-epikatechin. Oligomery a polymery těchto látek se nazývají kondenzované taniny, které mají výrazné organoleptické vlastnosti, neboť jsou nositeli trpké chutě. Lze je nalézt ve významných množstvích jak ve slupce tak semenech vinných hroznů, odkud se mohou extrahovat do moštu. Flavan-3-oly byly studovány pro své antioxidační, antikarcinogenní, antimutagenní antibakteriální nebo antivirotické vlastnosti.

Stilbeny jsou podskupinou fenolických látek, které se vyskytují běžně v celé rostlinné říši. Hrozny révy vinné a víno jsou však považovány za nejdůležitější dietární zdroj těchto látek. Rostlina je produkuje jako sekundární metabolit, který se objevuje při reakci na stres, zejména chladový a napadení mikroorganismy. Bylo dokázáno, že jsou konzumentovi prospěšné, díky svým antioxidačním, antikarcinogenním a antimutagenním vlastnostem [76,84].

Jeden z nejvíce prozkoumaných stilbenů je sloučenina zvaná *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilben). Rostlina ho produkuje zejména jako reakci na plísňová onemocnění, například u botrytických sběrů. V souvislosti s různými fázemi výroby vína i kvalitou surovin byl v posledních letech důkladně prostudován, neboť se právě v souvislosti s touto sloučeninou nejvíce zmiňuje "Francouzský paradox" [80,81].

Nejvýznamnějším derivátem kyseliny hydroxyskořicové vyskytujícím se ve víně je kyselina kaftarová, což je kyselina kávová substituovaná na karboxylové skupině kyselinou vinnou. Tyto látky se v potravinách vyskytují převážně ve své *trans*- formě, neboť ta je stabilnější než forma *cis*-. Obsah těchto látek ve víně ovlivňuje spousta faktorů, obecně lze však říci, že při skladování jejich koncentrace roste. Dalšími důležitými faktory jsou odrůda a pěstitelské a klimatické podmínky [76,85].

Deriváty kyseliny benzoové jsou další skupinou fenolových kyselin, které jsou obsaženy v révovém víně. Mezi nejdůležitější deriváty patří kyselina gallová. Ve víně se objevují především v monomerní podobě a podobně jako deriváty kyseliny hydroxyskořicové je jejich obsah ovlivněn širokou škálou faktorů. Kyselina gallová je velmi dobře absorbována v trávicím traktu příjemce, proto má významné fyziologické účinky. Je to silný antioxidant schopný zhaset volné kyslíkové radikály, ale některé studie prokázaly cytotoxickou aktivitu této

kyseliny. Estery této kyseliny se přidávají do některých potravin jako syntetické antioxidanty [76-85].

## 2 CÍLE PRÁCE

Cílem dizertační práce je vybrat a sledovat důležité markery kvality hroznového vína a studovat změnu jejich obsahu s ohledem na použitou technologii výroby vína. Jednou z mála oblastí technologie výroby vína, která je prozkoumána v malém měřítku (v porovnání s ostatními částmi výroby), je řízené biologické odbourávání kyseliny jablečné.

Dílčí cíle jsou pak následující:

- 1) Provádět rešerši se zaměřením na malolaktickou fermentaci a výběr potencionálních markerů kvality.
- 2) Určení markerů kvality z hlediska jakosti vína. Po počátečním studiu literatury byly vybrány následující sloučeniny, které jsou potencionální markery jakosti hroznového vína: organické kyseliny (L-jablečná, vinná, L-mléčná, citronová, jantarová, octová) a dikarboxylové sloučeniny (glyoxal, metylglyoxal, diacetyl, pentan-2,3-dion).
- 3) Určení markerů kvality z hlediska zdravotní nezávadnosti vína. Po počátečním studiu literatury byly vybrány následující sloučeniny, které jsou potencionální markery zdravotní nezávadnosti hroznového vína: biogenní aminy (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin, histamin, tyramin) a antioxidanty (antioxidační aktivita, obsah celkových polyfenolů, stanovení jednotlivých antioxidantů).
- 4) Provedení laboratorních experimentů s cílem získání analytických metod pro stanovení vybraných markerů.
- 5) Validace metod na reálné vzorky hroznového vína.
- 6) Provedení experimentů s reálným vzorkem, tedy s hroznovým vínem během a po malolaktické fermentaci.
- 7) Statistické zpracování získaných dat a stanovení závěrů experimentu.
- 8) Vyvození doporučení v oblasti technologické praxe výroby hroznového vína s aplikací řízené malolaktické fermentace.

### **3 ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ**

Určené cíle dizertační práce byly naplněny v následujících 3 experimentálních částech. Studium odborných textů není zařazeno do žádné z těchto částí, neboť probíhalo průběžně po celou dobu zpracovávání této dizertační práce.

#### **3.1. Fáze I**

V první části dizertační práce bylo cílem vybrat potencionální markery kvality hroznového vína a vybrat a prověřit analytické metody pro jejich stanovení. Laboratorní analýzy vybraných sloučenin probíhaly jak s čistými formami těchto látek, tak v přítomnosti složité biologické matrice. Alternativou jednoduchého přímého stanovení markerů byla úprava vzorku před analýzou, případně použití takových separačních a extrakčních technik, které umožní přesné a relativně snadné, rychlé a levné stanovení vybraných látek. Z metod analytické chemie byl kladen důraz na použití vysoce účinné kapalinové chromatografie a iontově-výměnné chromatografie. Z detektorů použitelných v kombinaci s těmito přístroji byla preferována detekce pomocí UV detektoru, případně pomocí jednoduché kolorimetrické detekce. Důvody pro vybrání těchto metod a detektorů je jejich snadná dostupnost a všeobecné rozšíření při zachování vysoké citlivosti a přesnosti měření.

#### **3.2. Fáze II**

Po ukončení první experimentální části a validaci použitých technik byly založeny pokusy na reálných vzorcích hroznového vína. Druhá část experimentů dizertační práce byla zaměřena na sledování změn ve vínech různých odrůd zaočkovaných jedním komerčně dostupným přípravkem pro MLF. Všechny kroky fermentace mladého vína a přípravy vzorků vedly k tomu, aby se vzorky lišily pouze v jediném kroku technologie výroby, a to v použití řízené malolaktické fermentace. Vzhledem k tomu, že malolaktická fermentace by měla proběhnout nejpozději 14 dní po zaočkování, byla doba pokusu naplánována na 4 týdny s odběrem vzorků vždy po 3 dnech. V podnebí České republiky se doporučuje provádět řízené odbourávání kyseliny jablečné při výrobě červených vín. Do pokusu byly zařazeny odrůdy révy vinné Cabernet Moravia a Zweigeltrebe.

#### **3.3. Fáze III**

Ve třetí části experimentálních pokusů byla provedena stanovení vybraných markerů u vzorků hroznového vína, u kterých bylo použito stejné víno (stejný producent, odrůda i ročník) a které bylo zaočkováno odlišnými kulturními kmeny bakterií mléčného kvašení. Tato fáze pokusů měla prokázat vhodnost či nevhodnost konzorcií BMK pro řízené MLF.

### 3.4. Metodika získávání vzorků

#### 3.4.1. Vzorky hroznového vína pro fázi II

Pro fázi II byly použity vzorky vína po proběhnutí hlavního kvašení od vinaře Nikodéma Míši, který provozuje vinařství ve vinařské obci Polešovice, podoblasti Slovácko, vinařské oblasti Morava. Jednalo se o vzorky modrých odrůd hroznového vína Cabernet Moravia a Zweigeltrebe.

Vzorky byly odebírány pro každou odrůdu ve 2 různých liniích. Část vzorku (250 l vína) byla označena jako kontrolní, stejné množství vína bylo zaočkováno startovací odrůdou. Pro zaočkování byl použit zamražený a sušený startovací preparát na bílé a červené víno z vybraných kmenů kvasinek rodu *Oenococcus oeni* značky BIOSTART® FORTE SK2 (Erbslöh Geisenheim, Německo). U studovaných vín byla zajištěna optimální teplota pro správný průběh MLF, stejně tak byl hlídán obsah oxidu siřičitého a pH (hodnota pH na počátku kvašení v intervalu 3,3 – 3,5, teplota v průběhu celého procesu mezi 18 – 21 °C, obsah volného SO<sub>2</sub> méně než 15 mg.l<sup>-1</sup>).

První den odběru vzorků dané odrůdy byl vždy pro oba vzorky (kontrolní, zaočkovaný) společný. Vzorky byly odebírány po dobu 30 dnů v časovém rozpětí 3 dnů, celkový počet odběrů, včetně prvního dne, byl 11.

#### 3.4.2. Vzorky hroznového vína pro fázi III

Analyzované víno pocházelo ze sklizně 2008 a zpracované bylo průmyslově u velkovýrobce ve vinařské oblasti Morava. Analyzované víno bylo jednodrůdové, vyrobené z modré moštové odrůdy Frankovka jako víno červené.

Víno bylo po ukončení hlavního kvašení stočeno do dvou tanků. Následně byl každý tank inokulován jiným preparátem pro řízenou MLF. Tank 1 byl zaočkován preparátem Lalvin 31 (Scott Laboratories, Inc., Petaluma, USA). Tento preparát a vzorky vína zaočkované tímto preparátem jsou pro účely dizertační práce označeny jako víno 1. Tank 2 byl zaočkován preparátem BIOSTART VITALE SK11 (Erbslöh Geisenheim, Německo), v dizertační práci jsou tyto vzorky uváděny jako víno 2. V obou tancích byla zajištěna optimální teplota pro správný průběh MLF, stejně tak byl hlídán obsah oxidu siřičitého a pH (hodnota pH v intervalu 3,3 – 3,5, teplota mezi 18 – 21 °C, obsah volného SO<sub>2</sub> méně než 15 mg.l<sup>-1</sup>). Víno bylo po odběru zamrazeno a při mrazírenských teplotách bylo uchováváno do doby laboratorního měření.

Z tanků byly průběžně odebírány vzorky, celkový počet odběrů byl 15 v průběhu 93 dní (den -1. (den před inokulací); 0. (inokulace); 1.; 2.; 3.; 4.; 6.; 7.; 14.; 24.; 31.; 63.; 69.; 84.; 92. den).

### 3.5. Použité metody analytické chemie

Vzhledem k tomu, že celá první část experimentálních pokusů byla předmětem vlastního řešení dizertační práce, jsou metody stanovení popsány a upřesněny v dalším textu dizertační práce.

### 3.6. Statistické metody zpracování dat

Interpretace a kontrola jednotlivých výsledků

Průměrná odchylka je aritmetickým průměrem absolutních hodnot odchylek hodnot proměnné od jejich aritmetického průměru a bere v úvahu velikost všech hodnot numerické proměnné. Častěji je používána směrodatná odchylka (1), která větší odchylky zohledňuje více, než odchylky malé. Čím je směrodatná odchylka větší, tím více je rozdělení kolem průměru rozptýleno, čím je menší, tím více se všechny hodnoty hromadí kolem průměru. Variační koeficient (2) slouží k posouzení, je-li variabilita malá nebo velká, jde o relativní porovnání směrodatné odchylky s průměrem. Tato získaná hodnota pak slouží jak pro interpretaci výsledků, tak i jako zpětná kontrola měření. Výsledky měření jsou v této dizertační práci uváděny jako interval naměřených hodnot, který je vytvořen z aritmetického průměru naměřených hodnot  $\pm$  směrodatná odchylka. Data sloužící pro tuto analýzu byla získána vždy minimálně z 6 měření.

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (1)$$

$$v_x = \frac{s_x}{\bar{x}} \cdot 100 \quad [\%] \quad (2)$$

Vzájemné porovnání výsledků v jednotlivých experimentech

Pro porovnání dat pocházejících z jednotlivých experimentů byly použity metody výpočtu Pearsonova korelačního koeficientu a párového t-testu.

Předmětem výpočtu Pearsonova korelačního koeficientu je statistické stanovení lineární síly (těsnosti) sledovaných závislostí. Lze tedy zjistit, jestli změny v probíhajících dějích spolu souvisí a jak je tato změna závislá. Míru korelace vyjadřuje korelační koeficient, který může nabývat hodnot v intervalu od -1 do +1. Hodnota korelačního koeficientu -1 značí zcela nepřímou závislost (antikorelaci), zatímco hodnota +1 značí přímou závislost. Pokud je hodnota korelačního koeficientu rovna 0, nelze mezi znaky zjistit žádná lineární závislost. Pearsonův korelační koeficient (3) lze vypočítat podle aritmetických průměrů analyzovaných souborů dat, z výběrových rozptylů těchto dat a z hodnoty kovariance, což je absolutní hodnota míry vzájemné vazby mezi náhodnými veličinami.



$$r = \frac{s_{xy}}{\sqrt{s_x^2 \cdot s_y^2}}$$

(3)

Párový t-test je základním testem statistických hypotéz, který se týká závislých souborů a slouží k porovnání středních hodnot uspořádaných dvojic porovnávaných souborů. Pro výpočet je nejprve důležité zjistit aritmetický průměr a směrodatnou odchylku dat, respektive rozptyl ( $s^2$ ). Z těchto dat se zjistí testovací kritérium. Následně je nutné vyhledat tabulkovou kritickou hodnotu pro výběrový soubor  $n - 1$  (stupně volnosti) a zvolit hladinu významnosti. Podle vypočtených a zjištěných dat se pak určí, zda je hladina významnosti statisticky nevýznamná, významná nebo vysoce významná.

Metody statistické analýzy byly provedeny podle odborné literatury [86]. Pro výpočty byl použit program Microsoft Office 2010 (Microsoft, Redmond, USA).

## 4 VÝSLEDKY PRÁCE A DISKUZE

### 4.1 Výsledky a diskuze k fázi I

V rámci prvního experimentu byly studovány analytické metody pro zajištění nejlepších podmínek stanovení dříve vybraných markerů. Jak bylo upřesněno v kapitole cíle práce, patří mezi tyto markery organické kyseliny, dikarboxylové sloučeniny, biogenní aminy a látky antioxidační povahy. V následujícím textu budou upřesněny metody stanovení, popsány materiály a chemikálie použité při těchto stanoveních.

#### 4.1.1. Stanovení organických kyselin

Pro stanovení jednotlivých organických kyselin je velmi vhodná a často používaná metoda vysoce-účinné kapalinové chromatografie (HPLC) s různými typy detekce. Metoda HPLC, kromě kapilární elektroforézy, je také doporučena jako referenční metoda mezinárodní organizací pro révu vinnou a víno (International Organisation of Vine and Wine, OIV). Pro stanovení organických kyselin v rámci této dizertační práce byla použita jiná metodika, než jakou doporučuje OIV. Jejich metody sice dovolují stanovit větší množství kyselin, ale jedná se o dvě různé analýzy s jinými principy: o metodu iontově-výměnné chromatografie (IEC) a kapalinové chromatografie na obrácených fázích (RP-HPLC). Pro měření vybraných organických kyselin (L-jablečná, vinná, L-mléčná, citronová, jantarová, octová) v jednom kroku byla použita metoda RP-HPLC s UV detektorem [63,87-90].

#### **Materiál a metody**

Pro stanovení vybraných organických kyselin bylo použito běžné laboratorní vybavení (analytické váhy AFA-210 LC, automatické mikropipety Biohit PLC, mikrozkuhavky Vitrum, mikrofiltry MS<sup>®</sup> Nylon Syringe Filter 13 mm 0,45 μm, vialky Hewlett Packard, septa 8 mm Vitrum) a následující chemikálie: acetonitril, metanol, dihydrogenfosforečnan draselný, standardy organických kyselin. Všechny chemikálie byly pořízeny od firmy Sigma Aldrich (St. Luis, USA) a jejich čistota vyhovovala požadavkům Americké chemické společnosti (ACS). Měření probíhalo na chromatografické sestavě DIONEX ULTIMATIVE 3000 (Dionex Corporation, USA), která obsahovala chromatografickou pumpu, autosampler WPS-3000 SL/WPS-3000 RS a DAD detektor DAD-3000 RS/MWS-3000 RS.

Standardy i vzorky vín byly proměřovány při vlnové délce 210 nm. Pro měření byla použita kolona Gemini – NX 3μ C18 110Å od firmy Phenomenex (USA), jejíž rozměry byly 250 x 4,60 mm a předkolona Security Guard KJ0-4282 (Phenomenex, USA). Při analýze byla využita izokratická eluce a jako mobilní fáze byl použit vodný roztok 0,01 M dihydrogenfosforečnanu draselného a acetonitril v poměru 97 : 3, pH roztoku 0,01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> bylo upraveno na hodnotu 2,7. Eluce probíhala při teplotě 30 °C, objem nástřiku vzorku byl 10 μl

a průtok mobilní fáze byl nastaven na hodnotu  $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Doba analýzy jednoho vzorku byla 30 min.

Po analýze byla kolona promyta mobilní fází sestávající z  $0,01 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$  a acetonitrilu v poměru 50 : 50, doba promytí byla 15 minut.

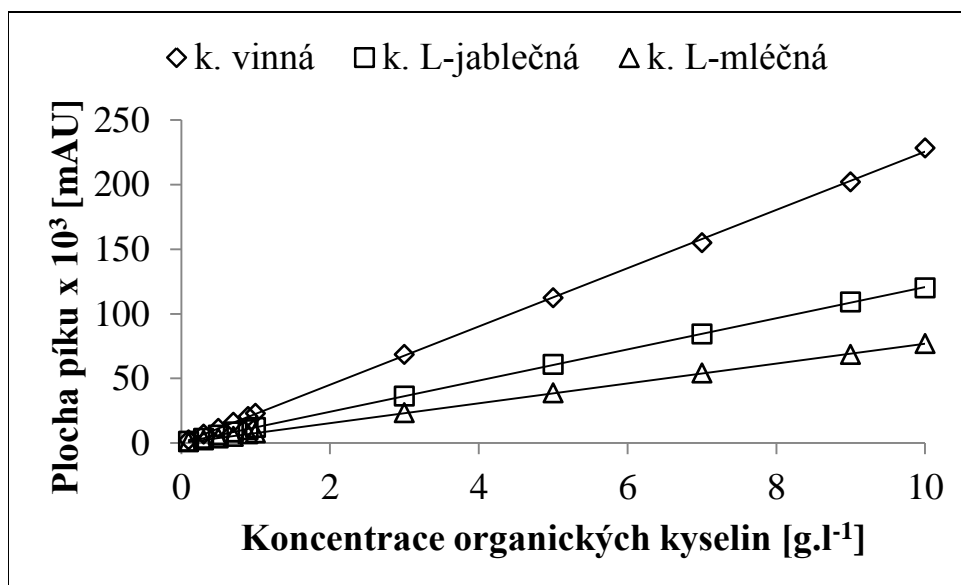
Vzorky vín byly před stanovením přefiltrovány pomocí mikrofiltrů do mikrozkušavek a přímo před stanovením převedeny do vialek. V případě, že nastala prodleva ve stanovení delší než 24 hodin, byl vzorek uchovávan při  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  a před samotným měřením byl šetrně rozmrazen a přefiltrován.

### **Kalibrace**

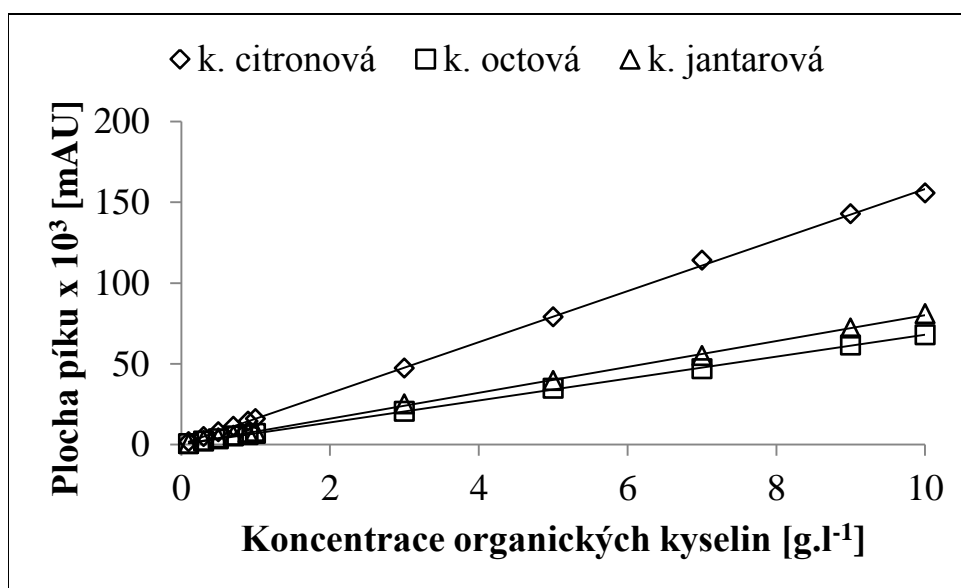
Pro kvantitativní analýzu organických kyselin byla použita metoda sestavení kalibračních křivek pomocí standardních roztoků organických kyselin s následným matematickým vyhodnocením. Standardní roztoky organických kyselin byly připraveny jako roztoky o koncentraci  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Z tohoto zásobního roztoku byla připravena kalibrační řada v rozmezí  $0,1$  až  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Takto připravené roztoky byly proměřeny podle stanovených podmínek a byla získána data pro sestavení rovnic kalibračních křivek, která představují závislost plochy píku [mAU] na koncentraci organické kyseliny [ $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]. Získané kalibrační křivky měly v uvedeném intervalu lineární charakter a jejich rovnice byly následující: kyselina vinná  $y = 22726x + 58,93$ , hodnota spolehlivosti  $R^2 = 0,9996$ ; kyselina L-jablečná  $y = 12131x + 11,83$ ,  $R^2 = 0,9997$ ; kyselina L-mléčná  $y = 7729,5x + 48,93$ ,  $R^2 = 1$ ; kyselina citronová  $y = 15858x + 71,2$ ,  $R^2 = 1$ ; kyselina octová  $y = 6858,4x + 21,23$ ,  $R^2 = 0,9986$ ; kyselina jantarová  $y = 8064,7x + 60,4$ ,  $R^2 = 0,9994$ . Kalibrační křivky jsou zobrazeny na obrázcích 5 a 6. Z naměřených dat byly vypočítány limity detekce jako  $\text{LOD } 3S/N$  ( $S = \text{šum}$ ,  $N = \text{směrnice kalibrační křivky}$ ): kyselina vinná  $2,38 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , kyselina L-jablečná  $4,45 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , kyselina L-mléčná  $6,99 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , kyselina citronová  $3,41 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , kyselina octová  $7,87 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , kyselina jantarová  $7,00 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

### **Návratnost a reprodukovatelnost**

Návratnost byla sledována po přidavku známého množství standardního roztoku organických kyselin. Bylo dosaženo návratnosti 96 – 105 % pro rozdílné koncentrace individuálních organických kyselin. Reprodukovatelnost metody byla zkoušena pomocí šesti analýz reprezentativních vzorků během 5 dnů.



*Obr. 5* Závislosti plochy píku na koncentraci standardních roztoků kyseliny vinné, L-jablečné a L-mléčné



*Obr. 6* Závislosti plochy píku na koncentraci standardních roztoků kyseliny citronové, octové a jantarové

#### 4.1.2. Stanovení dikarboxylových sloučenin

Dikarboxylové sloučeniny jsou svou povahou nízkomolekulární těkavé sloučeniny. Z toho také vyplývá, jaké metody se používají pro jejich stanovení. Mezi metody stanovení dikarboxylových sloučenin patří především optické metody (kolorimetrie, spektrofotometrie, fluorimetrie), gravimetrie, elektrochemické metody (polarografie) a především chromatografické metody [91-95]. Z chromatografických metod se pro stanovení používá jak plynová tak kapalinová chromatografie. Obě metody jsou také popsány organizací OIV jako

vhodné pro stanovení dikarboxylových sloučenin. V této dizertační práci byly použity dvě různé metody stanovení. Pro samostatné stanovení diacetylu byla použita metoda iontově-výměnné kapalinové chromatografie s UV-VIS detektorem, pro stanovení diacetylu, pentandionu, glyoxalu a metylglyoxalu byla použita metoda RP-HPLC s UV detektorem po derivatizaci s 2,3-diaminobenzenem [12].

### **Metoda stanovení diacetylu pomocí iontově-výměnné chromatografie**

#### **Materiál a metody**

Pro samostatné stanovení diacetylu bylo použito běžné laboratorní vybavení (laboratorní sklo a pomůcky, mikrofiltry MS<sup>®</sup> Nylon Syringe Filter 13 mm 0,45  $\mu\text{m}$ , dávkovací injekční stříkačka 50  $\mu\text{l}$  Hamilton, USA) a následující chemikálie: 85% vodný roztok kyseliny *o*-fosforečné a standard diacetylu. Všechny chemikálie byly pořízeny od firmy Sigma Aldrich a jejich čistota odpovídala standardům ACS. Pro měření byla použita chromatografická aparatura Hewlett Packard 1100, která byla sestavena z odplynovacího zařízení G1322A, binární pumpy G1312A, termostatu pro kolonu G1316A, dávkovacího ventilu se smyčkou 20  $\mu\text{l}$  a detektoru UV/VIS DAD G1315A. Standardy i vzorky byly proměřovány při vlnové délce 280 a 290 nm. Pro tuto metodu byla vybrána kolona Aminex HPX-87H Ion Exclusion Column 300 x 7,8 mm od firmy Bio-Rad (USA). Při analýze byla využita izokratická eluce a jako mobilní fáze byl použit 0,1% vodný roztok kyseliny trihydrogenfosforečné s upraveným pH na hodnotu 2,25. Doba jedné analýzy byla 30 minut, objem nástřiku vzorku byl 20  $\mu\text{l}$  a průtok mobilní fáze byl nastaven na hodnotu 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  [63].

Před stanovením byly analyzované vzorky přefiltrovány do mikrozkmavek. Takto upravený vzorek byl pomocí injekční stříkačky aplikován do dávkovacího kohoutu, případně byl uchován při teplotách  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  a před samotným stanovením byl šetrně rozmrazen.

#### **Kalibrace**

Pro kvantitativní analýzu diacetylu byla použita metoda sestavení kalibrační křivky pomocí standardního roztoku diacetylu s následným matematickým vyhodnocením. Standardní roztok byl připraven jako roztok o koncentraci 10  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Z tohoto zásobního roztoku byla připravena kalibrační řada v rozmezí 0,1 až 10  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Roztoky byly proměřeny a byla sestavena kalibrační křivka závislosti plochy píků na koncentraci diacetylu. Získaná rovnice kalibrační křivky byla následující:  $y = 27,197x + 0,8459$ , hodnota spolehlivosti  $R^2 = 0,9976$ . Z těchto dat byla vypočtena hodnota limitu detekce LOD 3S/N pro diacetyl 77,2  $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ .

#### **Návratnost a reprodukovatelnost**

Návratnost diacetylu byla sledována po přidavku jeho známého množství k červenému hroznovému vínu. Bylo dosaženo návratnosti 96 – 102 % pro rozdílné koncentrace diacetylu. Reprodukovatelnost metodiky byla analyzována během 5 dnů pomocí šesti reprezentativních vzorků.

## **Metoda detekce dikarbonylových sloučenin pomocí kapalinové chromatografie s derivatizací vzorku**

### **Materiál a metody**

Pro stanovení čtyř dikarbonylových sloučenin bylo použito běžné laboratorní vybavení (stejně jako při výše popsaných analýzách) a následující chemikálie: standardy dikarbonylových sloučenin (glyoxal, metylglyoxal, diacetyl a pentandion), 2,3-diaminobenzen, etanol, metanol, kyselina octová a hydroxid sodný. Všechny chemikálie byly pořízeny od firmy Sigma Aldrich a byly ACS čistoty. Měření probíhalo při 313 nm na chromatografické sestavě Peltier Perkin Elmer Flexar UHPLC FX-15, která obsahovala odplyňovací zařízení, binární pumpy, autosampler, termostat pro kolony a UV/VIS detektor stejné řady FX-15, dále byla použita kolona Phenomenex Gemini-NX 3  $\mu\text{m}$  C18 110Å (Torrance, USA) s předkolonou SecurityGuard od stejné firmy. Metoda byla izokratická, mobilní fázi představoval 2% vodný roztok kyseliny octové a metanol v poměru 95 : 5. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml.min<sup>-1</sup> [12].

### **Derivatizace vzorků před analýzou**

Před samotným stanovením byl vzorek vína upraven tak, aby bylo možné provést stanovení dikarbonylových sloučenin.  $\alpha$ -dikarbonylové sloučeniny reagují s 2,3-diaminobenzenem za vzniku derivátů chinoxalinu (benzopyrazinu), které jsou následně chromatograficky stanoveny. Podmínky derivatizace byly následující: 50 ml vzorku vína se upravilo vodným roztokem NaOH na hodnotu pH = 8; ke vzorku bylo přidáno 25 mg 2,3-diaminobenzenu; vzorek se neprodyšně uzavřel a reakční nádoba se na 3 hodiny ponořila do termostatu s nastavenou teplotou na 60 °C; po této době byl vzorek ochlazen, přefiltrován přes stříkačkový mikrofiltr a tak připraven k analýze.

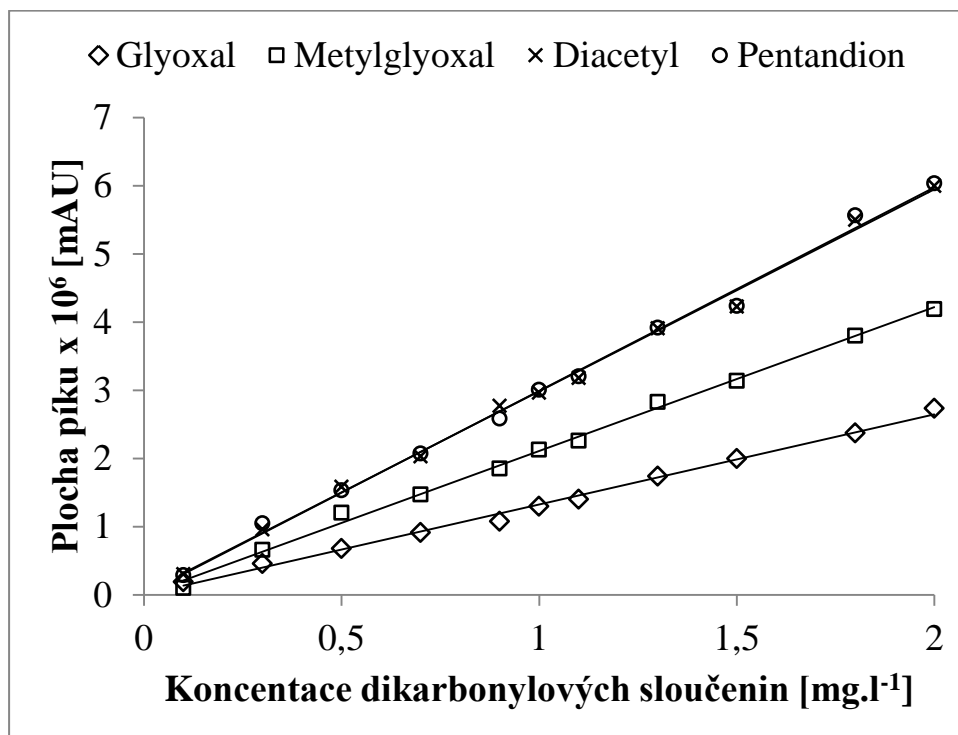
### **Kalibrace**

Kvantitativní analýza glyoxalu, metylglyoxalu, diacetylu a pentandionu byla provedena pomocí sestavení kalibračních křivek. Standardní roztoky byly připraveny ze zásobních roztoků o koncentraci 10 mg.l<sup>-1</sup> v intervalu koncentrací 0,1 – 2 mg.l<sup>-1</sup>. Roztoky byly proměřeny podle výše popsané metody a byly sestaveny kalibrační křivky závislosti plochy píků na koncentraci dikarbonylových sloučenin. Získané rovnice kalibračních křivek jsou následující: glyoxal  $y = 1321913x + 4528$ ,  $R^2 = 0,9950$ ; metylglyoxal  $y = 2108424x + 1982$ ,  $R^2 = 0,9969$ ; diacetyl  $y = 2963851x + 20915$ ,  $R^2 = 0,9957$ ; pentandion  $y = 2985624x + 5049$ ,  $R^2 = 0,9957$ . Kalibrační křivky pro dikarbonylové sloučeniny jsou zobrazeny na obrázku 4.3. Ze získaných dat byly vypočteny limity detekce LOD = 3S/N pro jednotlivé sloučeniny takto: glyoxal 252,67 ng.l<sup>-1</sup>, metylglyoxal 158,41 ng.l<sup>-1</sup>, diacetyl 170,07 ng.l<sup>-1</sup>, pentandion 111,87 ng.l<sup>-1</sup>.

### **Návratnost a reprodukovatelnost**

Návratnost dikarbonylových sloučenin byla sledována po přidavku jejich známého množství k červenému hroznovému vínu. Bylo dosaženo návratnosti

92 – 111 % pro rozdílné koncentrace dikarbonylových sloučenin. Reprodukovatelnost metodiky byla analyzována během 5 dnů pomocí šesti reprezentativních vzorků.



Obr. 7 Závislosti plochy píku na koncentraci standardních roztoků glyoxalu, metylglyoxalu, diacetylů a pentandionu

#### 4.1.3. Stanovení obsahu biogenních aminů

Biogenní aminy jsou svou povahou nízkomolekulární netěkavé dusíkaté sloučeniny, z toho vyplývá základ pro jejich analytické stanovení. V literatuře je popsáno několik technik jejich stanovení, které zahrnují metody tenkovrstvé chromatografie, plynové chromatografie, kapilární elektroforézy a kapalinové chromatografie. V praxi se nejčastěji používají pokročilé chromatografické metody separace na reverzních fázích nebo iontově-výměnná chromatografie s fluorescenční a UV detekcí po danzylaci, benzoylaci nebo derivatizaci s 9-fluorometyl chloroformátem, N-hydroxysuccinimidyl-6-chinoly karmátem nebo o-ftadialdehydem nebo postkolonové derivatizaci ninhydrinem. Při iontově-výměnné chromatografii se biogenní aminy oddělují na koloně podle toho, jaký za daných podmínek nesou elektrický náboj a tím jsou slaběji či silněji schopny přilnout k částicím ionexu. Kromě velikosti a tvaru molekul a hydrofobního efektu uplatňují především rozdílné acidobazické vlastnosti stanovovaných sloučenin. Při postkolonové derivatizaci jsou po výstupu z kolony jednotlivé složky míseny s ninhydrinovým činidlem a s ním následně reagují v průtočném reaktoru. Barevné produkty reakce jsou detekovány fotometricky. Pro stanovení biogenních aminů byla využita iontově-výměnná

chromatografie s postkolonovou derivatizací ninhydrinem a kolorimetrickou detekcí [96-100].

### **Materiál a metody**

Pro stanovení biogenních aminů bylo použito běžné laboratorní vybavení a následující chemikálie: standardy biogenních aminů (Sigma Aldrich), kyselina chlorovodíková, monohydrát kyseliny citronové, dihydrát citranu sodného, chlorid sodný, thiodiglycol, kyselina boritá a azid sodný. Chemikálie kromě standardů biogenních aminů byly pořízeny od firmy Ingos (Praha, Česká republika). Měření probíhalo na automatickém analyzátoru aminokyselin AAA 400.

Kalibrace této metody nebyla předmětem studia této dizertační práce, neboť byla vyvinuta a validována na pracovišti již dříve. Proto ve své dizertační práci neuvádím podmínky kalibrace ani výpočty limitů detekce, návratnosti a reprodukovatelnosti metody.

Úprava vzorku před analýzou spočívala ve zmražení vzorku na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a následnou lyofilizaci na zařízení ALPHA 1-4 LSC (sublimační sušení). Poté byl k vysušenému vzorku přidán sodnocitrátový pufr o pH 2,2 o objemu 3 ml. Následovalo třepání na třepačce (40 minut) a převedení vzorků do mikrozkušavek. Takto upravený vzorek byl ponechán při chladničkových teplotách po dobu 48 hodin, poté byl odstředěn (20000 g po dobu 45 minut a teplotě  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a přefiltrován přes mikrofiltr.

#### **4.1.4. Stanovení obsahu antioxidantů**

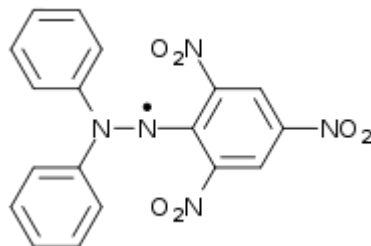
Stanovení obsahu antioxidantů je možné mnoha různými způsoby. Jednak lze studovat obsah jednotlivých antioxidantů, a to především pomocí chromatografických a elektromigračních metod, jednak lze stanovovat celkový účinek antioxidantů v potravinách – antioxidační aktivitu. Ta je definována jako schopnost látky inhibovat oxidační degradaci různých sloučenin. Pro hodnocení antioxidační aktivity potravin především rostlinného původu byly vypracovány mnohé metody. Jsou to metody principiálně značně odlišné, navíc se různě modifikují pro specifickou studovanou matici. Mezi základní metody stanovení antioxidační aktivity patří metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), chemické metody založené na schopnosti kyslíkových radikálů odbarvovat činidla (ORAC, ABTS, DPPH) s následným spektrofotometrickým stanovením a metody fyzikální měření elektronové spinové rezonance, stanovení redoxního potenciálu nebo chemiluminiscence. Pro stanovení jednotlivých skupin antioxidantů byly také definovány jednoduché metody. Příkladem jsou metody pro stanovení celkového obsahu polyfenolů. Jsou založeny na reakci polyfenolických látek se specifickým činidlem, které po reakci dává barevnou reakci změřitelnou spektrofotometricky [101-106].

V této dizertační práci byla použita metoda stanovení celkové antioxidační aktivity DPPH a metoda stanovení celkového obsahu polyfenolů FCM.



## Metoda DPPH

Tato metoda je jednou ze základních metodik posouzení antiradikálové aktivity biologické matrice. Je založena na schopnosti stabilního volného radikálu 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu reagovat s donory vodíku. DPPH vykazuje velmi silnou absorpci v UV/VIS spektru, reakcí s donory vodíku se absorpce snižuje. Intenzivní fialové zbarvení je způsobeno nepárovým elektronem na dusíku hydrazylu. Reakce je proto nejčastěji sledována spektrofotometricky, pokles absorbance při 517 nm se měří po uplynutí konstantního času, případně se sleduje kinetická změna absorbance. U směsných vzorků se radikálová aktivita vyjadřuje v ekvivalentech kyseliny L-askorbové.



*Obr. 8 Molekula 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu*

Antioxidační aktivita se pak vypočítá jako úbytek absorbance podle rovnice:

$$(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \cdot 100$$

kde  $A_0$  je absorbance pracovního roztoku DPPH

$A_1$  je absorbance studovaného vzorku.

## Metoda FCM

Tato metoda stanovení polyfenolů je založena na reakci Folin-Ciocalteova činidla s fenolickými látkami. Jinak je nazývána taky metoda GAEM (Gallic Acid Equivalent Method), podle kyseliny gallové, která se používá jako standardní látka. Folin-Ciocalteovo činidlo je tvořeno směsí kyseliny fosforečno-wolframové ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) a kyseliny fosforečno-molybdenové ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), které se po oxidaci fenolů redukují na směs modrých oxidů wolframu ( $W_8O_{23}$ ) a molybdenu ( $Mo_8O_{23}$ ). Vytvořené modré zbarvení silně absorbuje v oblasti  $\lambda = 765$  nm a je úměrné celkovému množství původně přítomných fenolových sloučenin.

### Materiál a chemikálie pro analýzy

Ke stanovení bylo použito běžného laboratorního vybavení zahrnující laboratorní sklo, analytické váhy, mikrofiltry, mikropipety. Spektrofotometrické měření bylo prováděno na zařízení UVmini-1240 (Shimadzu). Chemikálie potřebné k analýze byly pořízeny od firmy Sigma Aldrich (DPPH, kyselina gallová, kyselina L-askorbová) a od firmy Penta (Folin-Ciocalteovo činidlo, uhličitan sodný bezvodý, metanol).

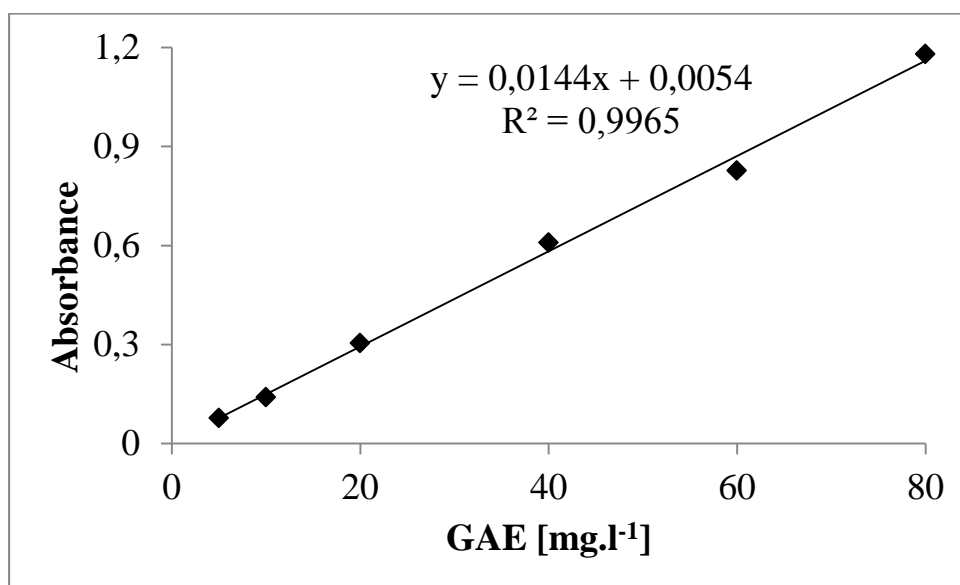
## Metodika měření

Vzorky byly uchovávány před zpracováním zamrazené v tmavých neprůhledných nádobách. Před vlastním stanovením proběhlo jejich šetrné rozmrazení a vzorek byl zbaven sedimentu pevných nečistot na stříkačkovém mikrofiltru.

Pro stanovení celkového obsahu polyfenolů byla použita metoda FCM, kdy byly standardy i vzorky vín proměřovány při vlnové délce 765 nm. Pro stanovení celkové antioxidační aktivity byla vybrána metoda DPPH, kdy byly vzorky i standardy proměřovány při 515 nm.

Metodika FCM probíhala následovně: do 10 ml odměrné baňky bylo přidáno postupně 0,1 ml vzorku vína, 0,5 ml Folin-Ciocalteova činidla a 1,5 ml 20% roztoku uhličitanu sodného. Následně byl objem v baňce doplněn po rysku deionizovanou vodou. Poté byl vzorek znovu přefiltrován přes mikrofiltr, protože došlo k zakalení roztoku v odměrné baňce. Absorbance byla změřena proti slepému vzorku, který představoval stejný poměrný roztok Folin-Ciocalteova činidla, 20% roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a deionizované vody.

Celkový obsah polyfenolů byl vypočítán pomocí kalibrační křivky, která byla sestavena po proměření standardních roztoků kyseliny gallové v koncentračním rozmezí 5 až 80  $\text{mg}\cdot 100\text{ml}^{-1}$ . Výsledně se koncentrace polyfenolů ve vzorku vyjadřuje v jednotkách  $\text{mg GAE}\cdot 100\text{ ml}^{-1}$ , což je jednotka vyjadřující ekvivalentní množství kyseliny gallové v mg na 100 ml vzorku. Závislost absorbance na koncentraci standardních roztoků kyseliny gallové je zobrazena na obrázku 9.

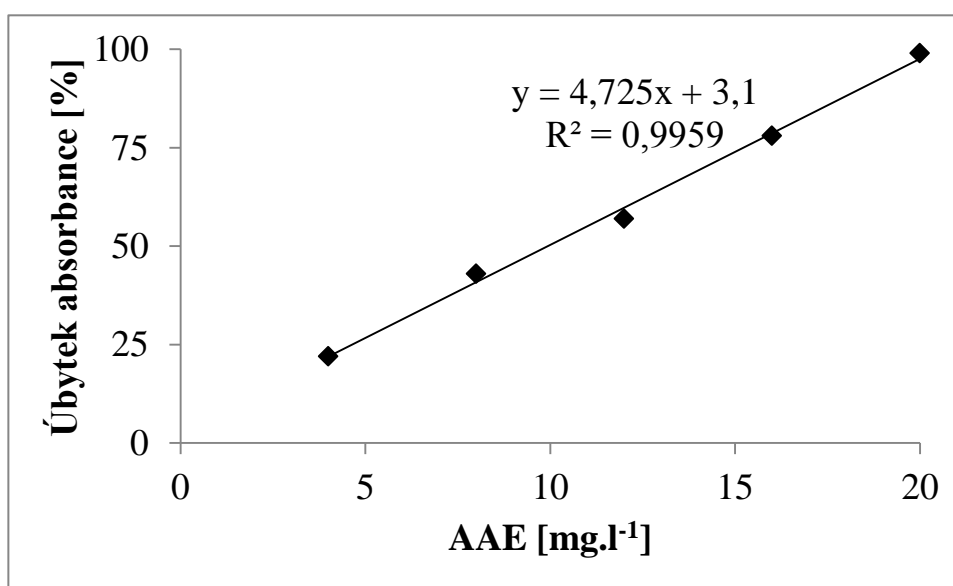


*Obr. 9* Závislost absorbance na koncentraci standardních roztoků kyseliny gallové

Metodika DPPH spočívala nejprve v přípravě zásobního roztoku sloučeniny DPPH, což byl roztok 0,024 g DPPH v 100 ml metanolu. Tento zásobní roztok byl uložen při  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  a sloužil k přípravě pracovního roztoku, který představoval 10 ml zásobního roztoku zředěného 45 ml metanolu. Tento

pracovní roztok se spektrofotometricky proměřil proti slepému vzorku (metanol) a tak byla získána hodnota  $A_0$  potřebná pro výpočet úbytku absorbance. Pro měření vzorku bylo do 10 ml odměrné baňky připraveno 450  $\mu\text{l}$  vzorku vína a 8,55 ml pracovního roztoku DPPH. Směs se nechala v temnu po dobu přesně 60 minut a poté byla měřena absorbance  $A_1$  potřebná pro výpočet hodnoty úbytku absorbance.

Celková antioxidační aktivita byla vypočtena pomocí kalibrační křivky sestavené pomocí standardních roztoků kyseliny L-askorbové v rozmezí hodnot 4 až 20  $\text{mg}\cdot 100\text{ml}^{-1}$ . Úbytky absorbance byly pomocí regresní rovnice přepočteny na hodnotu  $\text{mg AAE}\cdot 100\text{ ml}^{-1}$ , což jsou jednotky vyjadřující antioxidační aktivitu v ekvivalentním množství kyseliny L-askorbové na 100 ml vzorku. Závislost absorbance na koncentraci standardních roztoků kyseliny L-askorbové je zobrazena na obrázku 10.



*Obr. 10 Závislost úbytku absorbance na koncentraci standardních roztoků kyseliny L-askorbové*

Reprodukovatelnost metodik byla analyzována během 5 dnů pomocí šesti reprezentativních vzorků.

## **4.2. Výsledky a diskuze k fázi II**

Pokusná fáze II byla zaměřena na studium vzorků vína modrých moštových odrůd révy vinné Cabernet Moravia a Zweigeltrebe, kdy proměnným faktorem během výroby byla aplikace řízené MLF pomocí stejného komerčně dostupného přípravku. U vzorků byla zjištěna hodnota množství organických kyselin, diacetylu, biogenních aminů, celkové antioxidační aktivity a celkového obsahu polyfenolů.

#### 4.2.1. Výsledky a diskuze stanovení organických kyselin

Výsledky stanovení organických kyselin u vín z pokusné fáze II jsou zobrazeny postupně v tabulkách 2 až 13. V těchto tabulkách je označením "c" myšlena hmotnostní koncentrace dané kyseliny ve vzorku vína, označením "VK" je myšlen variační koeficient. Zkratka "ND" ukazuje, že daná kyselina nebyla ve vzorku detekována, tedy že její koncentrace byla pod limitem detekce metody. V tabulkách 2 až 7 jsou zobrazeny výsledky stanovení organických kyselin pro odrůdu Cabernet Moravia.

**Tab. 2** Obsah kyseliny vinné u vína odrůdy Cabernet Moravia

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	0,51	1,91	0,51	1,91
10.12.	0,47	0,24	0,51	0,13
13.12.	0,41	0,16	0,52	0,02
16.12.	0,34	0,87	0,51	0,09
19.12.	0,31	0,07	0,54	0,08
21.12.	0,33	0,02	0,55	0,03
23.12.	0,34	0,02	0,48	0,02
27.12.	0,30	0,05	0,50	0,02
30.12.	0,31	0,09	0,55	0,06
3.1.	0,30	0,07	0,51	0,03
7.1.	0,32	0,13	0,52	0,03

**Tab. 3** Obsah kyseliny L-jablečné u vína odrůdy Cabernet Moravia

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	5,30	1,05	5,30	1,05
10.12.	5,21	0,37	5,30	0,08
13.12.	4,50	0,07	5,37	0,04
16.12.	2,20	0,04	5,31	0,16
19.12.	1,94	0,15	5,32	0,05
21.12.	2,02	0,06	5,25	0,05
23.12.	1,95	0,02	5,25	0,02
27.12.	1,99	0,02	5,29	0,06
30.12.	2,01	0,05	5,29	0,04
3.1.	1,98	0,02	5,38	0,01
7.1.	2,01	0,09	5,30	0,03

**Tab. 4** Obsah kyseliny L-mléčné u vína odrůdy Cabernet Moravia

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	0,17	2,65	0,17	2,65
10.12.	0,19	2,39	0,16	0,39
13.12.	0,53	0,98	0,16	1,53
16.12.	1,40	0,23	0,18	0,34
19.12.	1,48	0,36	0,17	3,20
21.12.	1,53	0,21	0,21	0,32
23.12.	1,52	0,16	0,22	0,48
27.12.	1,48	0,12	0,18	1,48
30.12.	1,45	0,25	0,21	0,29
3.1.	1,34	0,14	0,18	1,16
7.1.	1,35	0,29	0,20	0,61

**Tab. 5** Obsah kyseliny citronové u vína odrůdy Cabernet Moravia

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	0,25	1,06	0,25	1,06
10.12.	0,23	0,74	0,25	0,83
13.12.	0,12	0,49	0,24	0,30
16.12.	0,07	0,64	0,24	0,20
19.12.	0,01	0,13	0,23	0,60
21.12.	ND	---	0,24	0,34
23.12.	ND	---	0,23	0,21
27.12.	ND	---	0,23	0,13
30.12.	ND	---	0,23	0,15
3.1.	ND	---	0,24	0,20
7.1.	ND	---	0,24	0,18

**Tab. 6** Obsah kyseliny octové u vína odrůdy Cabernet Moravia

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	1,59	2,14	1,59	2,14
10.12.	1,62	0,74	1,86	0,07
13.12.	1,61	0,79	1,79	0,10
16.12.	1,50	0,61	1,78	0,16
19.12.	1,49	0,55	1,79	0,12
21.12.	1,63	0,35	1,75	0,03
23.12.	1,70	0,24	1,86	0,12
27.12.	1,81	0,11	1,77	0,16
30.12.	1,95	0,23	1,79	0,04
3.1.	2,12	0,10	1,80	0,05
7.1.	2,25	0,10	1,76	0,10

**Tab. 7** Obsah kyseliny jantarové u vína odrůdy Cabernet Moravia

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	1,09	1,20	1,09	1,20
10.12.	1,11	0,33	1,12	0,08
13.12.	1,14	0,11	1,11	0,08
16.12.	1,12	0,12	1,09	0,06
19.12.	1,09	0,07	1,09	0,13
21.12.	1,13	0,08	1,08	0,06
23.12.	1,10	0,14	1,13	0,10
27.12.	1,10	0,09	1,08	0,10
30.12.	1,11	0,12	1,09	0,13
3.1.	1,09	0,11	1,09	0,07
7.1.	1,10	0,18	1,08	0,18

Z výsledků stanovení organických kyselin je patrné, že vlivem MLF došlo k rozdílnému vývoji jejich koncentrací. Změny v obsahu kyselin L-jablečné a L-mléčné se daly předpokládat vzhledem k povaze technologického zákroku. Po 6 dnech po inokulaci začala u zaočkovaného vína klesat koncentrace kyseliny L-jablečné, naopak obsah kyseliny L-mléčné začal stoupat. Trend změny byl ukončen po 12 dnech po inokulaci, kdy se koncentrace kyselin vyrovnala a do ukončení pokusu se výrazně neměnila. Zajímavé je, že 6 dní po inokulaci začala nepatrně klesat i koncentrace kyseliny vinné. Již původní naměřené hodnoty této kyseliny jsou poměrně nízké, vlivem MLF klesla koncentrace kyseliny vinné u zaočkovaného vína na přibližně 60 % původního obsahu. K podobnému jevu došlo také u kyseliny citronové, kdy u zaočkovaného vína nastal také po 6 dnech pokles koncentrace. Tento pokles pokračoval až do úplného vyčerpání kyseliny citronové ve víně, který nastal 14 dnů po inokulaci. Rozdílný vývoj byl pozorován i u koncentrace kyseliny octové. U této kyseliny nastala změna i u kontrolního vzorku, kdy již 3 dny po zahájení sledování byla zjištěna vyšší koncentrace této kyseliny, která se však dále až do ukončení sledování neměnila. U zaočkovaného vína byla nejprve koncentrace kyseliny octové stálá, ale po 12 dnech po inokulaci byl zjištěn trend růstu koncentrace, při ukončení pokusu to bylo přibližně 140 % původního množství. Jedinou kyselinou, jejíž koncentrace se vlivem MLF neměnila, byla kyselina jantarová, u té byla vyrovnaná koncentrace od zahájení pozorování do jeho ukončení přibližně  $1,10 \text{ g.l}^{-1}$ .

Statistické zpracování dat ukázalo následující výsledky: mezi změnou koncentrace kyseliny L-jablečné a L-mléčné byla statisticky zjištěna velmi těsná antikorelace – 0,9937. Naopak mezi změnou koncentrace kyseliny L-jablečné a vinné byla prokázána vysoká korelace 0,9709. I korelace mezi změnou obsahu kyseliny L-jablečné a kyseliny citronové byla vysoká, její hodnota byla vypočtena 0,9654. Další hodnoty korelačních koeficientů buď souvisí s již uvedenými hodnotami (vztah mezi kyselinami je podobný, neboť jsou statisticky těsné) nebo jejich hodnoty ukazují, že mezi koncentracemi neexistuje lineární závislost.

Po provedení párového t-testu byly zjištěny následující výsledky: mezi kontrolními a zaočkovanými vzorky existoval statisticky velmi významný rozdíl ( $P \leq 0,01$ ) u kyselin vinné, L-jablečné, L-mléčné a citronové. Statisticky nevýznamný rozdíl ( $P > 0,05$ ) byl zaznamenán u kyselin octové a jantarové.

V tabulkách 8 až 13 jsou zobrazeny výsledky stanovení organických kyselin pro odrůdu Zweigeltrebe.

**Tab. 8** Obsah kyseliny vinné u vína odrůdy Zweigeltrebe

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	0,76	0,06	0,76	0,06
10.12.	0,52	0,13	0,75	0,05
13.12.	0,55	0,07	0,75	0,06
16.12.	0,47	0,10	0,74	0,07
19.12.	0,40	0,04	0,77	0,05
21.12.	0,39	0,13	0,70	0,06
23.12.	0,32	0,43	0,71	0,16
27.12.	0,34	0,06	0,72	0,09
30.12.	0,37	0,08	0,75	0,08
3.1.	0,35	0,02	0,62	0,04
7.1.	0,31	0,18	0,52	0,14

**Tab. 9** Obsah kyseliny L-jablečné u vína odrůdy Zweigeltrebe

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	5,28	0,04	5,28	0,04
10.12.	5,01	0,06	5,24	0,03
13.12.	5,08	0,06	5,33	0,14
16.12.	4,54	0,04	5,33	0,19
19.12.	3,80	0,02	5,26	0,04
21.12.	2,59	0,08	5,43	0,05
23.12.	1,68	0,04	5,31	0,06
27.12.	1,30	0,05	5,31	0,08
30.12.	1,36	0,13	5,26	0,09
3.1.	1,27	0,06	5,18	0,06
7.1.	1,25	0,29	5,32	0,05



**Tab. 10** Obsah kyseliny L-mléčné u vína odrůdy Zweigeltrebe

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	0,18	0,58	0,18	0,58
10.12.	0,18	0,34	0,16	1,06
13.12.	0,26	0,46	0,17	1,03
16.12.	0,37	0,49	0,22	1,81
19.12.	0,66	0,29	0,23	0,61
21.12.	1,11	0,96	0,20	0,30
23.12.	1,45	0,34	0,18	1,93
27.12.	1,43	0,96	0,17	1,60
30.12.	1,40	0,10	0,20	2,81
3.1.	1,38	0,28	0,16	2,33
7.1.	1,37	0,31	0,16	1,06

**Tab. 11** Obsah kyseliny citronové u vína odrůdy Zweigeltrebe

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	0,26	0,09	0,26	0,09
10.12.	0,24	0,43	0,26	0,37
13.12.	0,25	0,07	0,26	0,82
16.12.	0,24	0,53	0,23	0,97
19.12.	0,23	0,52	0,23	0,94
21.12.	0,11	2,05	0,25	0,24
23.12.	0,07	0,96	0,23	1,23
27.12.	0,06	0,62	0,24	0,11
30.12.	ND	---	0,23	0,36
3.1.	ND	---	0,23	0,74
7.1.	ND	---	0,24	0,31

**Tab. 12** Obsah kyseliny octové u vína odrůdy Zweigeltrebe

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	1,87	0,09	1,87	0,09
10.12.	1,78	0,16	1,84	0,03
13.12.	1,84	0,04	1,87	0,08
16.12.	1,76	0,09	1,85	0,06
19.12.	1,73	0,09	1,79	0,16
21.12.	1,68	0,23	1,71	0,00
23.12.	1,66	0,20	1,84	0,16
27.12.	1,63	0,11	1,85	0,12
30.12.	1,90	0,11	1,81	0,02
3.1.	2,40	0,02	1,78	0,11
7.1.	2,52	0,15	1,84	0,21

**Tab. 13** Obsah kyseliny jantarové u vína odrůdy Zweigeltrebe

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [g.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	1,07	0,17	1,07	0,17
10.12.	1,03	0,15	0,98	0,15
13.12.	1,08	0,12	0,99	0,23
16.12.	1,04	0,08	0,99	0,13
19.12.	1,05	0,09	0,97	0,06
21.12.	1,04	0,18	1,02	0,03
23.12.	1,02	0,96	0,98	0,07
27.12.	1,01	0,08	0,98	0,14
30.12.	0,99	0,14	0,96	0,13
3.1.	1,01	0,18	0,95	0,25
7.1.	0,99	0,16	0,98	0,13

Z naměřených výsledků je patrné, že změna obsahu organických kyselin u vína odrůdy Zweigeltrebe má podobný trend jako víno odrůdy Cabernet Moravia. K poklesu koncentrace kyseliny L-jablečné a zároveň k růstu koncentrace kyseliny L-mléčné došlo 9 dní po inokulaci. Trend změny koncentrace byl ukončen 20 dní po inokulaci, kdy došlo k vyrovnání obsahu kyselin a jejich obsah se do ukončení sledování neměnil. U kyseliny vinné došlo ke snížení koncentrace u zaočkovaného vína již 3 dny po inokulaci, pokles koncentrace oproti kontrolnímu vzorku pokračoval až do ukončení sledování. Konečná koncentrace kyseliny vinné u zaočkovaného vína představovala přibližně 40 % původního množství. Koncentrace kyseliny citronové u zaočkovaného vína klesala oproti obsahu této kyseliny u kontrolního vzorku. Trend poklesu započal 14 dní po inokulaci, 23 dní po inokulaci klesla koncentrace této kyseliny pod limit detekce metody. Obsah kyseliny octové byl u obou řad vzorků vyrovnaný až do 20 dní po inokulaci, poté u zaočkovaného vína došlo k nárůstu koncentrace až do maxima, které bylo změřeno při ukončení sledování 31 dnů po inokulaci. Obsah kyseliny jantarové se vlivem MLF neměnila.

Statistické zpracování dat ukázalo následující výsledky: změny koncentrace kyseliny L-jablečné a L-mléčné byly v těsné antikorelaci, hodnota Pearsonova koeficientu byla  $-0,9926$ . Trend změn obsahu kyselin L-jablečné a vinné mezi sebou koreloval, hodnota koeficientu byla vypočítána  $0,8537$ . Změny v koncentracích kyseliny L-jablečné a citronové byly těsné, hodnota koeficientu byla vypočítána  $0,9744$ . Ostatní vypočtené hodnoty poukazyvaly spíše na lineární nezávislost.

Po provedení párového t-testu byly zjištěny následující výsledky: mezi kontrolními a zaočkovanými vzorky existoval statisticky velmi významný rozdíl ( $P \leq 0,01$ ) u kyselin vinné, L-jablečné, L-mléčné a citronové. Statisticky nevýznamný rozdíl ( $P > 0,05$ ) byl zaznamenán u kyselin octové a jantarové.

Při vzájemném porovnání dat párovým t-testem naměřených u zaočkovaných vín odrůd Cabernet Moravia a Zweigeltrebe nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ( $P > 0,05$ ) mezi obsahem všech sledovaných kyselin kromě kyseliny jantarové, u které byl shledán statisticky velmi významný rozdíl ( $P \leq 0,01$ ). Provedení výpočtů Pearsonova korelačního koeficientu dalo tyto hodnoty: kyselina vinná  $0,9042$ , L-jablečná  $0,7909$ , L-mléčná  $0,7788$ , citronová  $0,7330$ , octová  $0,8339$ , jantarová  $0,3202$ .

U stanovených vzorků je zajímavý nízký obsah kyseliny vinné. To může být způsobeno špatným ročníkem, případně nevyhovujícími klimatickými podmínkami nebo nedostatečnou technologickou zralostí hroznů. Nízké koncentrace kyseliny vinné mohou ukazovat i na odkyselování vína, případně na vysrážení kyseliny vinné s draselnými ionty v podobě hydrogenvinanu draselného, který se může tvořit už v hroznech, zrajících na půdách bohatých na draslík [2,3]. Všechny tyto faktory mohou vést k fyziologicky vyššímu obsahu kyseliny L-jablečné v hroznech a tím následně i v moštích a ve vínech.

Odbourání kyseliny citronové je jev doprovázející MLF u obou odrůd vína. Z hlediska tvorby dikarboxylových sloučenin je tento jev považovaný za negativní.

#### 4.2.2. Výsledky a diskuze stanovení diacetylu

Výsledky stanovení diacetylu u vín z pokusné fáze II jsou zobrazeny v tabulkách 14 (Cabernet Moravia) a 15 (Zweigeltrebe).

**Tab. 14** Obsah diacetylu u vína odrůdy Cabernet Moravia

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	0,143	2,03	0,143	2,03
10.12.	0,148	3,45	0,135	3,41
13.12.	0,192	4,79	0,163	3,74
16.12.	0,193	4,40	0,177	4,29
19.12.	0,200	4,65	0,174	4,77
21.12.	0,213	4,93	0,204	0,54
23.12.	0,217	4,61	0,201	0,60
27.12.	0,210	1,91	0,219	4,70
30.12.	0,223	4,57	0,240	0,50
3.1.	0,232	4,66	0,228	3,73
7.1.	0,227	1,15	0,246	2,93

**Tab. 15** Obsah diacetylu u vína odrůdy Zweigeltrebe

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	0,258	0,97	0,258	0,97
10.12.	0,418	4,02	0,562	2,30
13.12.	0,572	3,25	0,596	3,69
16.12.	0,616	1,07	0,614	0,44
19.12.	0,638	1,41	0,637	2,64
21.12.	0,596	1,73	0,605	4,28
23.12.	0,554	3,77	0,630	3,49
27.12.	0,646	3,20	0,716	0,71
30.12.	0,630	3,98	0,701	3,94
3.1.	0,590	1,34	0,745	0,54
7.1.	0,662	4,52	0,862	1,37

U obou řad vzorků je patrný vzestup koncentrace diacetylu, zároveň výsledky ukazují na rozdílnou původní koncentraci diacetylu u různých odrůd vína. Nicméně u odrůdy Cabernet Moravia došlo k vzestupu koncentrace na přibližně 160 % původního množství, zatímco u vín odrůdy Zweigeltrebe došlo k vzestupu na přibližně 260 % původního množství.

Získané výsledky byly podrobeny statistické analýze, která dala následující závěry: koncentrace diacetylu u vína odrůdy Cabernet Moravia mezi zaočkovaným i kontrolním vzorkem korelovala, hodnota korelačního koeficientu byla zjištěna 0,9150 a zároveň po provedení párového t-testu bylo zjištěno, že rozdíly mezi výsledky nejsou statisticky významné ( $P > 0,05$ ). Podobných výsledků bylo dosaženo po provedení statistické analýzy u vína odrůdy Zweigeltrebe (hodnota korelačního koeficientu byla 0,8838). Naopak po provedení párového t-testu mezi zaočkovanými vzorky bylo zjištěno, že rozdíly mezi odrůdami jsou statisticky velmi významné ( $P \leq 0,01$ ).

Statistická analýza ukazuje, že se MLF pravděpodobně nepodílí na tvorbě diacetylu, ale ukazuje na fakt, že množství diacetylu ve vzorku může být ovlivněno odrůdou, kdy jeho koncentrace u odrůdy Zweigeltrebe byly změřeny vyšší a také došlo k většímu nárůstu koncentrace této látky.

U vína Cabernet Moravia je znát za celou dobu pozorování nárůst množství diacetylu, jak u zaočkovaných, tak kontrolních vzorků. Na druhou stranu, konečná koncentrace se od počáteční liší pouze o  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ , což je pod mezí rozpoznatelnosti této sloučeniny. Zajímavý je také pokles koncentrace diacetylu u vzorků z konce pozorování u zaočkovaného vína, kdežto u kontrolní řady byl zaznamenán stálý mírný nárůst koncentrace. Možným vysvětlením tohoto jevu je metabolismus kyseliny citronové, kdy je diacetyl přeměňován na další produkty metabolismu této organické kyseliny (zejména acetoin a 2,3-butandiol).

Vzestupný trend obsahu diacetylu byl zjištěn také u vína odrůdy Zweigeltrebe. Zde je patrný nejvýraznější nárůst množství diacetylu u zaočkované i kontrolní řady do 12. dne po inokulaci. U kontrolní řady dále narůstá obsah diacetylu do 20. dne po inokulaci. Poté se koncentrace měnila jen minimálně, na rozdíl od vína odrůdy Cabernet Moravia není zaznamenán pokles jejího množství.

Vyšší koncentrace diacetylu u kontrolních vzorků by bylo možno vysvětlit spontánním MLF, i když tuto hypotézu nepotvrdila měření organických kyselin [107].

#### **4.2.3. Výsledky a diskuze stanovení biogenních aminů**

Pomocí analyzátoru aminokyselin AAA 400 byly vzorky prověřeny na přítomnost histaminu, fenyletylaminu, tyraminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu. U vzorků vín odrůdy Cabernet Moravia byla potvrzena přítomnost histaminu, fenyletylaminu, putrescinu a spermidinu, u vzorků vín odrůdy Zweigeltrebe byla potvrzena přítomnost 3 biogenních aminů,

fenyletylaminu, putrescinu a spermidinu. Výsledky stanovení biogenních aminů jsou zobrazeny v tabulkách 16 až 22.

**Tab. 16** Obsah histaminu u vína odrůdy Cabernet Moravia

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	0,310	4,15	0,310	4,15
10.12.	0,308	3,92	0,347	3,48
13.12.	0,335	3,66	0,325	2,77
16.12.	0,280	1,66	0,345	3,84
19.12.	0,250	3,96	0,297	4,27
21.12.	0,230	4,30	0,298	4,03
23.12.	0,225	4,59	0,284	4,79
27.12.	0,219	2,35	0,240	5,21
30.12.	0,229	5,31	0,208	5,81
3.1.	0,200	3,19	0,170	6,90
7.1.	0,140	4,56	0,170	6,62

**Tab. 17** Obsah fenyletylaminu u vína odrůdy Cabernet Moravia

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	0,162	4,78	0,162	4,78
10.12.	0,180	6,26	0,349	4,00
13.12.	0,140	7,94	0,361	3,66
16.12.	0,130	1,62	0,432	3,03
19.12.	0,135	7,52	0,456	3,04
21.12.	0,168	3,25	0,451	3,02
23.12.	0,145	7,02	0,455	3,23
27.12.	0,153	6,66	0,421	3,61
30.12.	0,244	1,29	0,407	2,98
3.1.	0,258	4,54	0,356	4,02
7.1.	0,339	3,73	0,309	3,93

**Tab. 18** Obsah putrescinu u vína odrůdy Cabernet Moravia

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	0,483	0,62	0,483	0,62
10.12.	0,608	4,03	0,575	2,26
13.12.	0,589	1,87	0,633	2,71
16.12.	0,643	2,22	0,836	2,44
19.12.	0,767	5,97	0,882	5,20
21.12.	0,789	1,69	0,841	2,12
23.12.	0,853	1,68	0,803	2,24
27.12.	0,974	1,82	0,754	1,98
30.12.	1,020	3,15	0,768	4,68
3.1.	1,497	5,86	0,815	2,40
7.1.	1,995	1,59	0,753	6,03

**Tab. 19** Obsah spermidinu u vína odrůdy Cabernet Moravia

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	0,562	2,76	0,562	2,76
10.12.	0,559	6,31	0,584	1,82
13.12.	0,520	0,61	0,632	2,76
16.12.	0,549	4,77	0,597	5,92
19.12.	0,562	1,01	0,479	5,71
21.12.	0,545	4,99	0,271	6,23
23.12.	0,519	2,51	ND	---
27.12.	0,535	6,14	ND	---
30.12.	0,615	4,36	ND	---
3.1.	0,652	5,54	ND	---
7.1.	0,621	4,18	ND	---

**Tab. 20** Obsah fenyletylaminu u vína odrůdy Zweigeltrebe

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	1,040	1,24	1,040	1,24
10.12.	1,029	5,00	1,038	4,93
13.12.	1,086	3,82	0,859	5,93
16.12.	0,983	5,22	0,870	6,06
19.12.	0,962	5,76	0,899	5,20
21.12.	0,890	6,35	0,810	6,32
23.12.	0,800	1,29	0,835	6,10
27.12.	0,813	5,62	0,824	6,16
30.12.	0,797	6,40	0,700	5,81
3.1.	0,800	4,68	0,695	3,01
7.1.	0,797	4,94	0,692	4,47

**Tab. 21** Obsah putrescinu u vína odrůdy Zweigeltrebe

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	1,188	4,31	1,188	4,31
10.12.	1,495	3,46	1,080	4,75
13.12.	1,453	5,27	1,221	3,36
16.12.	1,347	3,32	1,107	4,70
19.12.	1,625	1,19	1,168	4,46
21.12.	1,700	1,20	1,088	3,79
23.12.	1,869	2,27	1,159	4,40
27.12.	2,546	0,87	1,167	1,03
30.12.	3,166	3,88	1,147	4,59
3.1.	4,518	2,69	1,181	1,85
7.1.	5,061	3,46	1,177	2,85



**Tab. 22** Obsah spermidinu u vína odrůdy Zweigeltrebe

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	1,110	4,59	1,110	4,59
10.12.	1,199	4,28	1,158	4,45
13.12.	1,020	5,04	1,244	2,52
16.12.	1,047	1,13	1,182	1,78
19.12.	0,977	3,16	1,149	3,60
21.12.	0,961	5,26	1,090	4,64
23.12.	0,986	1,15	1,094	2,83
27.12.	0,946	2,22	1,105	4,66
30.12.	1,031	3,01	1,091	5,62
3.1.	0,964	2,19	1,124	4,51
7.1.	0,899	5,63	1,120	1,85

Výsledky stanovení biogenních aminů ukazují velmi nízkou koncentraci těchto látek, které tak nejsou životu nebezpečné. Přesto je zde zaznamenán jistý trend v jejich produkci, i rozdíly mezi odrůdami vína.

U vzorků vína odrůdy Cabernet Moravia byla analyzována přítomnost histaminu, fenylalaninu, putrescinu a spermidinu. U histaminu nastal po zaočkování trend poklesu koncentrace, a to jak u zaočkovaného, tak kontrolního vzorku. Konečná koncentrace se pohybovala na úrovni 45 – 55 % původního množství. Statistická analýza prokázala, že mezi zaočkovaným a kontrolním vínem nebyl statisticky významný rozdíl ( $P > 0,05$ ). U fenyletylaminu byl pozorován zajímavý trend změn. U zaočkovaného vína byla koncentrace nejprve vyrovnaná, aby 23 dní po zaočkování začala koncentrace narůstat. U kontrolního vzorku byl pozorován nárůst koncentrace hned na počátku sledování, kdy maxima koncentrace bylo dosaženo 12. až 17. den od počátku sledování. Následně došlo k poklesu koncentrace. U obou řad byla koncentrace fenyletylaminu na konci pozorování přibližně 190 – 210 % původního množství. Statistická analýza prokázala, že mezi studovanými vzorky existuje statisticky velmi významný rozdíl ( $P \leq 0,01$ ). Velmi zajímavé výsledky byly pozorovány u putrescinu. I když je konečná koncentrace u zaočkovaného a kontrolního vzorku velmi rozdílná, u zaočkovaného činí cca 410 % původní koncentrace, u kontrolního asi 150 % původní koncentrace, nebyl mezi sledovanými řadami zjištěn statisticky významný rozdíl ( $P > 0,05$ ). Důvodem bude nejspíš to, že koncentrace putrescinu v obou řadách byla vyrovnaná téměř po celou dobu sledování, po 17. dni po inokulaci nastal rozdílný vývoj ve změně koncentrace. U spermidinu nastal také zajímavý trend. U zaočkovaného vína byl trend ve

vývoji koncentrace stálý, koncentrace se výrazně neměnila, po ukončení pokusu byla naměřena hodnota cca 110 % původní koncentrace spermidinu. U kontrolního vzorku byla koncentrace nejprve vyrovnaná, 12 dní po inokulaci byl zaznamenán pokles obsahu a 17 dní po inokulaci klesla koncentrace spermidinu pod mez detekce metody. U tohoto vzorku byl vypočten statisticky velmi významný rozdíl v koncentraci spermidinu ( $P \leq 0,01$ ).

U vzorků vína odrůdy Zweigeltrebe byla analyzována přítomnost fenyletylaminu, putrescinu a spermidinu. Zatímco u fenyletylaminu nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ( $P > 0,05$ ) mezi vzorky zaočkovaného a kontrolního vína, u putrescinu a spermidinu byl nalezen mezi zaočkovaným a kontrolním vínem statisticky velmi významný rozdíl ( $P \leq 0,01$ ). Co se týká trendů, tak obsah fenyletylaminu klesal u zaočkovaného i kontrolního vína na přibližně 65-75 % původní koncentrace. Trend změny obsahu spermidinu u kontrolního vzorku nebyl patrný, u zaočkovaného vzorku se snižoval na přibližně 80 % původní koncentrace. Nejzajímavější trend byl zaznamenán u obsahu putrescinu, kdy u kontrolní řady nebyla zaznamenána výrazná změna konečné koncentrace od původní (přes výkyvy v průběhu měření), kdežto u zaočkovaného vína došlo k nárůstu koncentrace putrescinu na cca 425 % původní koncentrace.

Celkově lze shrnout, že MLF měla u vzorků vína odrůdy Zweigeltrebe negativní vliv na produkci spermidinu, ale velmi pozitivní vliv na produkci putrescinu. Lze předpokládat, že pokud by bylo ve víně více prekurzorů pro vznik biogenních aminů, byla by u zaočkovaného vína výrazně zvýšena hladina především putrescinu.

Po porovnání zaočkovaných vzorků vína v závislosti na odrůdě byly zjištěny také zajímavé rozdíly. Nejenže u vína odrůdy Cabernet Moravia byl stanoven histamin, jehož přítomnost u vína odrůdy Zweigeltrebe nebyla zjištěna, ale i obsahy ostatních nalezených biogenních aminů měly odlišné trendy koncentračních změn. U fenyletylaminu je rozdíl nejen v absolutní koncentraci, ale také v trendu: zatímco u vína odrůdy Cabernet Moravia dochází k nárůstu koncentrace po zaočkování, u vína odrůdy Zweigeltrebe dochází k poklesu koncentrace. Statistickou analýzou byl zjištěn velmi významný rozdíl mezi oběma vzorky ( $P \leq 0,01$ ). U putrescinu se lišila jak původní tak konečná koncentrace, a i když byl mezi oběma řadami shledán velmi významný statistický rozdíl ( $P \leq 0,01$ ), zároveň byla zjištěna statistická těsnost vyjádřená hodnotou Pearsonova variačního koeficientu 0,9722. U spermidinu se také lišilo absolutní množství této látky na počátku a na konci sledovaného období, zároveň bylo prokázáno, že mezi řadami existuje statisticky velmi významný rozdíl ( $P \leq 0,01$ ). Důležitý rozdíl je také v tom, že u odrůdy Cabernet Moravia byla koncentrace spermidinu po zaočkování vyrovnaná, kdežto u kontroly došlo k poklesu koncentrace až pod limit detekce metody, u odrůdy Zweigeltrebe byl trend opačný, kdy u zaočkovaného vína došlo k poklesu koncentrace, kdežto u kontrolního vzorku byla koncentrace vyrovnaná.

Na závěr lze shrnout, že i když je vliv MLF na koncentraci biogenních aminů významný (např. putrescin), projevují se zde i odrůdové vlastnosti jednotlivých vín, které mohou specificky ovlivňovat trend vývoje koncentrace biogenních aminů v závislosti na čase (např. spermidin). Přítomné biogenní aminy zároveň odpovídají zjištění jiných autorů [108-111].

#### 4.2.4. Výsledky a diskuze stanovení antioxidantů

Výsledky stanovení celkové antioxidační aktivity a celkového obsahu polyfenolů jsou shrnuty v tabulkách 23 až 26.

Celkový obsah polyfenolů byl stanoven pomocí metody FCM, tedy za použití Folin-Ciocalteova činidla metodikou popsanou v předchozí kapitole. V tabulce 23 jsou zobrazeny výsledky měření celkového obsahu polyfenolů pro víno odrůdy Cabernet Moravia, v tabulce 24 výsledky pro odrůdu Zweigeltrebe.

U vzorků vína odrůdy Cabernet Moravia byla naměřena počáteční hodnota celkového obsahu polyfenolů přibližně 25 mg GAE.100 ml<sup>-1</sup>, což je velmi nízká hodnota, přesto se v literatuře dají nalézt odkazy na takto nízké koncentrace u červeného vína [112-114]. U zaočkovaného vína poté došlo k nárůstu celkového obsahu polyfenolů, konečná hodnota byla přibližně 115 % původního obsahu. U kontrolního vína tento nárůst zaznamenán nebyl. Po statistické analýze lze říci, že mezi zaočkovaným a kontrolním vínem existuje statisticky velmi významný rozdíl ( $P \leq 0,01$ ).

**Tab. 23** Celkový obsah polyfenolů u vína odrůdy Cabernet Moravia

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	GAE [mg.100ml <sup>-1</sup> ]	VK [%]	GAE [mg.100ml <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	24,76	2,38	24,76	2,38
10.12.	27,46	2,17	24,00	5,11
13.12.	29,80	1,83	23,98	2,49
16.12.	29,44	2,25	24,04	5,66
19.12.	29,70	1,38	24,16	2,51
21.12.	28,80	2,17	24,34	3,89
23.12.	27,96	1,66	24,32	1,08
27.12.	28,08	2,14	24,32	1,35
30.12.	28,68	4,36	24,40	3,49
3.1.	28,96	2,58	24,54	1,08
7.1.	28,44	4,69	24,56	4,95

**Tab. 24** Celkový obsah polyfenolů u vína odrůdy Zweigeltrebe

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	GAE [mg.100ml <sup>-1</sup> ]	VK [%]	GAE [mg.100ml <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	26,28	4,91	26,28	4,91
10.12.	28,02	2,58	25,92	4,35
13.12.	30,56	1,35	26,94	3,71
16.12.	31,84	3,27	26,68	5,49
19.12.	31,34	3,46	27,38	6,00
21.12.	31,52	4,33	27,64	1,74
23.12.	31,48	3,00	27,20	3,07
27.12.	32,36	3,68	28,34	3,46
30.12.	32,76	3,64	28,36	1,53
3.1.	34,28	3,75	28,50	3,96
7.1.	34,14	2,87	28,40	1,13

U vzorků vína odrůdy Zweigeltrebe byla naměřena původní hodnota celkového obsahu polyfenolů přibližně 26 mg GAE.100 ml<sup>-1</sup>, což je opět velmi nízká hodnota. Po zaočkování došlo k nárůstu celkového obsahu polyfenolů, u zaočkovaného vína byla hodnota na konci pokusu přibližně 130 % původního množství. U kontrolního vzorku došlo také ke změně, konečný obsah tvořil přibližně 110 % původního množství. Po provedení statistického výpočtu bylo zjištěno, že mezi zaočkovaným a kontrolním vzorkem existuje statisticky velmi významný rozdíl ( $P \leq 0,01$ ).

Po porovnání zaočkovaných vzorků různých odrůd mezi sebou bylo zjištěno, že mezi vzorky existuje statisticky velmi významný rozdíl ( $P \leq 0,01$ ) a zároveň hodnota korelačního koeficientu neukazuje na přílišnou těsnost vzorků, byla zjištěna hodnota 0,6799. To je způsobeno pravděpodobně rozdílným trendem vývoje po 9 dnech po inokulaci.

Na závěr lze shrnout, že hodnota celkového obsahu polyfenolů měřená metodou FCM u sledovaných odrůd je ovlivňována jednak MLF, ale i mezi odrůdami existují statisticky velmi významné rozdíly.

Celková antioxidační aktivita byla měřena pomocí metody DPPH. Výsledky stanovení celkové antioxidační aktivity jsou zobrazeny v tabulkách 25 a 26. U vzorků vína odrůdy Cabernet Moravia byla naměřena počáteční hodnota celkové antioxidační aktivity přibližně 20 mg AAE.100 ml<sup>-1</sup>, což je hodnota srovnatelná s hodnotami nalezenými v literatuře [112-115]. U obou sledovaných řad došlo během pokusu k nárůstu celkové antioxidační aktivity, konečná hodnota byla přibližně 110 % původního obsahu. Po statistické analýze lze říci, že mezi zaočkovaným a kontrolním vínem neexistuje statisticky významný rozdíl ( $P > 0,05$ ).

U vzorků vína odrůdy Zweigeltrebe byla naměřena původní hodnota celkové antioxidační aktivity přibližně 23 mg AAE.100 ml<sup>-1</sup>. Po zaočkování se hodnota celkové antioxidační aktivity prakticky neměnila, až do ukončení sledování. Po statistické analýze lze říci, že mezi zaočkováním a kontrolním vínem neexistuje statisticky významný rozdíl ( $P > 0,05$ ).

**Tab. 25** Celková antioxidační aktivita u vína odrůdy Cabernet Moravia

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	AAE [mg.100ml <sup>-1</sup> ]	VK [%]	AAE [mg.100ml <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	19,81	4,23	19,81	4,23
10.12.	20,29	4,59	20,71	3,91
13.12.	20,31	4,93	20,81	3,07
16.12.	20,64	4,00	20,85	3,79
19.12.	20,71	4,93	21,00	1,58
21.12.	20,86	4,75	20,91	4,86
23.12.	21,02	4,09	21,13	4,08
27.12.	21,23	4,10	21,20	4,91
30.12.	21,38	4,83	21,56	3,43
3.1.	21,39	4,06	21,96	3,22
7.1.	21,77	4,10	22,12	1,56

**Tab. 26** Celková antioxidační aktivita u vína odrůdy Zweigeltrebe

Datum odběru	ZAOČKOVANÉ VÍNO		KONTROLNÍ VÍNO	
	AAE [mg.100ml <sup>-1</sup> ]	VK [%]	AAE [mg.100ml <sup>-1</sup> ]	VK [%]
7.12.	22,62	3,96	22,62	3,96
10.12.	22,19	3,55	22,41	3,06
13.12.	22,09	3,46	22,33	4,89
16.12.	22,04	3,10	22,31	2,09
19.12.	22,11	4,41	22,35	3,68
21.12.	22,34	2,18	22,43	4,52
23.12.	22,65	1,94	22,48	1,76
27.12.	22,82	4,33	22,47	4,66
30.12.	22,80	1,74	22,45	4,24
3.1.	22,74	3,60	22,44	2,97
7.1.	22,53	3,61	22,39	3,46

Na závěr této kapitoly budou krátce shrnuty dosažené výsledky z pokusné fáze II.

Stanovení organických kyselin prokázalo účelné užití BMK pro řízenou MLF. Mezi zaočkovanými i kontrolními vzorky u obou odrůd došlo k statisticky velmi významné změně u koncentrací kyselin vinné, L-jablečné, L-mléčné a citronové, naopak u kyselin octové a jantarové nedošlo k statisticky významným změnám. Statistické porovnání dat získaných ze zaočkovaných řad obou odrůd ukázalo vyšší těsnost změn všech sledovaných kyselin, kromě kyseliny jantarové. Lze tedy říci, že rozdíly v obsahu kyselin jsou ovlivněny spíše rozdílnou technologií (MLF), nikoli odrůdou.

Stanovením diacetylu bylo zjištěno, že neexistují statisticky významné rozdíly mezi zaočkovanými a kontrolními vzorky, naopak existuje statisticky velmi významný rozdíl mezi zaočkovanými řadami obou sledovaných odrůd. Lze tedy říci, že rozdíly v obsahu diacetylu jsou ovlivněny spíše rozdílnou odrůdou, nikoli technologií. Statistické porovnání výsledků stanovení organických kyselin a diacetylu ukázalo, že mezi koncentrací kyseliny citronové a diacetylu existuje korelace vyjádřená hodnotou korelačního koeficientu 0,8652 pro víno odrůdy Cabernet Moravia a 0,8366 pro víno odrůdy Zweigeltrebe.

Stanovení biogenních aminů ukázalo přítomnost fenyletylaminu, putrescinu a spermidinu u obou odrůd, u odrůdy Cabernet Moravia ještě navíc histaminu. U vína odrůdy Cabernet Moravia se prokázal statisticky velmi významný rozdíl mezi zaočkovanými a kontrolními vzorky u fenyletylaminu a spermidinu, naopak u histaminu a putrescinu nebyl nalezen statisticky významný rozdíl. U vína odrůdy Zweigeltrebe byl zjištěn statisticky velmi významný rozdíl u putrescinu a spermidinu, u fenyletylaminu zjištěn nebyl. Porovnání zaočkovaných vzorků obou odrůd byl zjištěn statisticky velmi významný rozdíl u fenyletylaminu, putrescinu i spermidinu, zároveň u putrescinu byla zjištěna statistická těsnost vyjádřená hodnotou korelačního koeficientu 0,9722. Lze tedy shrnout, že obsah biogenních aminů ve vzorcích vína byl ovlivněn jak technologií, tak odrůdou.

Analýza celkového obsahu polyfenolů a celkové antioxidační aktivity ukázala, že se sice vlivem MLF statisticky významně liší vzorky zaočkované a kontrolní z hlediska celkového obsahu polyfenolů, ale z hlediska celkové antioxidační aktivity jsou rozdíly mezi různými řadami statisticky nevýznamné.

### **4.3. Výsledky a diskuze k fázi III**

Pokusná fáze III byla zaměřena na studium vzorků vína modré moštové odrůdy révy vinné Frankovka, kdy proměnným faktorem během výroby byla aplikace různých komerčních přípravků pro řízenou MLF. U vzorků byla zjištěna hodnota dikarboxylových sloučenin, biogenních aminů, celkové antioxidační aktivity a celkového obsahu polyfenolů.

#### 4.3.1. Výsledky a diskuze stanovení dikarboxylových sloučenin

Metodou HPLC-UV s derivatizací vzorku pomocí 2,3-diaminobenzenu byla ve vzorcích vína stanovena přítomnost glyoxalu, metylglyoxalu, diacetylu a pentandionu. Výsledky jsou zobrazeny v tabulkách 27 a 30. V tabulkách je doba odběru vztažena k inokulaci, kdy den inokulace je den 0, jako „víno 1“ je označeno víno zaočkované přípravkem Lalvin 31, jako „víno 2“ je označeno víno zaočkované přípravkem Biostart Vitale SK11. „VK“ značí variační koeficient, „c“ vyznačuje hmotnostní koncentraci dané látky.

**Tab. 27** Obsah glyoxalu ve vzorcích vína z pokusné fáze III

Doba odběru	VÍNO 1		VÍNO 2	
	c [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	VK [%]	c [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	VK [%]
-1	118,90	0,59	118,90	0,59
0	118,42	2,05	119,24	2,17
1	118,77	2,78	124,57	1,89
2	121,03	2,05	165,09	1,41
3	123,04	0,82	201,80	3,11
4	164,18	3,68	209,37	1,67
6	195,55	1,06	204,63	0,85
7	202,41	1,82	171,42	2,67
14	198,90	1,09	146,56	0,49
24	198,13	1,50	142,23	3,33
31	197,89	0,33	136,11	0,44
63	196,29	1,97	125,80	2,66
69	193,77	1,03	114,44	2,39
84	176,43	2,27	110,65	3,23
92	150,29	0,43	100,18	1,15

Vývoj koncentrace glyoxalu je zobrazen v tabulce 27. U vína 1 se nejprve koncentrace významně neměnila. K výraznému vzrůstu koncentrace glyoxalu došlo po 4 dni po inokulaci (DPI). Po 7 DPI byla naměřena maximální hodnota, cca 170 % původního množství. Během následujících odběrů byla koncentrace stabilní, po 69 DPI došlo k významnému poklesu koncentrace. Po 92 DPI byla koncentrace na úrovni cca 125 % původního množství. U vína 2 nastal již 1 DPI nárůst obsahu glyoxalu. Maximální koncentrace byla naměřena 3 DPI, cca 175 % původního množství. Poté nastal rychlý pokles koncentrace, 7 DPI byla koncentrace cca 120 % původního množství. V následujících odběrech pravidelně klesala koncentrace až do minima naměřeného 92 DPI, přibližně 80% původního množství. Po provedení statistické analýzy bylo zjištěno, že mezi víny není statisticky významný rozdíl v koncentraci glyoxalu ( $P > 0,05$ ).

**Tab. 28** Obsah metylglyoxalu ve vzorcích vína z pokusné fáze III

Doba odběru	VÍNO 1		VÍNO 2	
	c [ $\mu\text{g.l}^{-1}$ ]	VK [%]	c [ $\mu\text{g.l}^{-1}$ ]	VK [%]
-1	26,02	2,55	26,02	2,55
0	26,33	2,48	26,36	0,65
1	23,82	3,31	26,77	0,19
2	20,01	0,06	34,77	0,90
3	18,73	1,05	36,20	0,39
4	17,48	2,60	37,87	0,99
6	16,21	1,75	37,40	0,51
7	15,69	1,51	37,26	0,19
14	14,80	0,80	36,85	1,07
24	14,99	1,89	35,34	1,34
31	14,72	0,35	33,00	0,29
63	12,16	1,64	32,34	1,32
69	9,81	1,94	30,90	0,63
84	6,09	3,08	30,66	0,09
92	1,02	3,00	30,19	0,26

Vývoj koncentrace metylglyoxalu ve vzorcích je zobrazen v tabulce 28. U vína 1 nastal po inokulaci pokles koncentrace, 14 DPI bylo naměřeno asi 60 % původního množství. Poté se koncentrace významně neměnila, 63 DPI byla asi 50 % původního množství. Následoval výrazný pokles koncentrace až do minima (cca 5 % původního množství) zjištěného 92 DPI. U vína 2 byl průběh odlišný. Po zaočkování došlo ke zvýšení koncentrace, maximální hodnota byla naměřena 3 DPI, představovala přibližně 150 % původního množství. Následně se koncentrace snižovala, 92 DPI dosáhla cca 115 % původního množství. Po provedení statistické analýzy se ukázalo, že existuje velmi významný statistický rozdíl ( $P \leq 0,01$ ) ve vývoji koncentrace metylglyoxalu v závislosti na použitém preparátu pro MLF.

Vývoj obsahu diacetylu ve vzorcích je zobrazen v tabulce 29. Již 1 den po inokulaci došlo k nárůstu obsahu diacetylu. U vína 1 dosáhla maximální koncentrace diacetylu po 2 DPI, přibližně 200 % počáteční koncentrace. Po dosažení tohoto maxima se začala koncentrace diacetylu snižovat, po 14 DPI klesla na hodnotu srovnatelnou s koncentrací při inokulaci. Poté následoval pozvolný pokles koncentrace, po 92 DPI byla naměřena hodnota na úrovni cca 90 % původní koncentrace. U vína 2 došlo po inokulaci také k významnému nárůstu koncentrace, po 7 DPI byla koncentrace diacetylu zhruba 300 % původní koncentrace. Až do ukončení pokusu se koncentrace pozvolna zvyšovala, po 92 DPI byla zjištěna maximální hodnota na úrovni přibližně



350 % původního množství. Výsledky statistické analýzy ukazují, že mezi víny je v koncentraci diacetylu vysoce významný statistický rozdíl ( $P \leq 0,01$ ).

**Tab. 29** Obsah diacetylu ve vzorcích vína z pokusné fáze III

Doba odběru	VÍNO 1		VÍNO 2	
	c [ $\mu\text{g.l}^{-1}$ ]	VK [%]	c [ $\mu\text{g.l}^{-1}$ ]	VK [%]
-1	79,93	0,11	83,67	1,64
0	83,60	1,63	85,00	1,26
1	125,78	1,52	182,10	1,05
2	156,57	1,33	182,93	0,19
3	142,47	0,33	199,55	0,37
4	130,76	1,38	226,21	0,71
6	106,94	0,77	233,26	0,51
7	99,35	0,59	233,83	0,53
14	87,24	0,38	239,14	0,41
24	73,83	0,15	245,57	0,36
31	73,73	2,14	247,02	0,50
63	72,73	0,64	251,59	0,58
69	72,50	0,07	260,64	0,89
84	70,58	1,81	265,72	0,69
92	70,03	0,78	276,73	1,49

V tabulce 30 jsou zaznamenány koncentrace pentandionu. Maximální hodnota, cca 330 % původního množství byla naměřena u vína 1 i vína 2, ale v rozdílné dny (2 a 4 DPI, resp.). U vína 1 následoval po dosažení maxima významný pokles koncentrace, 14 DPI byla koncentrace cca 170 % původní koncentrace, poté se obsah snižoval méně výrazně až do minima naměřeného 92 DPI, cca 25% původního množství. U vína 2 byl pokles koncentrace po dosažení maxima méně dynamický, 14 DPI byla koncentrace cca 275 % původního množství. Pozvolný pokles koncentrace trval až k minimu (cca 30% původní koncentrace) zjištěné 92 DPI. Statistická analýza potvrzuje, že mezi vínem 1 a 2 není statisticky významný rozdíl ve vývoji koncentrace pentandionu ( $P > 0,05$ ).

Z naměřených výsledků bylo statistickou analýzou prokázáno, že existuje vysoce významný statistický rozdíl v obsahu diacetylu a metylglyoxalu ve víně, a to v závislosti na použité starterové kultuře pro řízenou MLF. Naopak obsah pentandionu je ovlivněn startérovou kulturou minimálně, i když je zřejmé, že v důsledku MLF dochází v prvních dnech po zaočkování k nárůstu jeho koncentrace. U vína 1 lze ve sledovaném období sledovat trend poklesu koncentrace diacetylu a metylglyoxalu. Naopak koncentrace diacetylu ve vínu 2

významně roste. Práh rozpoznatelnosti diacetylu je pro vína udáván  $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$  [14], přičemž víno 2 tuto hranici překonává již 3 DPI a do konce sledování pod tuto hranici neklesne, proto lze říci, že aroma tohoto vína bude ovlivněno diacetylem. Pokles koncentrace diacetylu a metylglyoxalu u vína 1 lze vysvětlit tak, že tyto látky slouží jako prekurzory pro tvorbu dalších buketních látek, často v reakci se sirnými aminokyselinami [116]. Možným vysvětlením, proč k podobnému poklesu nedochází u vína 2, je inhibice těchto metabolických drah. Tento trend se netýká glyoxalu. Podle výsledků je patrné, že víno 1 je bohatším zdrojem glyoxalu než víno 2. Zároveň je tu zajímavý výsledek u vína 1, a to snižující se koncentrace glyoxalu a metylglyoxalu při posledních odběrech. Vzhledem k tomu, že kontrolní mikrobiologické testy neprokázaly nárůst počtu mikroorganismů ve víně ke konci sledovaného období, lze soudit, že tento pokles bude vyvolaný biochemickými přeměnami nemikrobiálního původu.

**Tab. 30** Obsah pentandionu ve vzorcích vína z pokusné fáze III

Doba odběru	VÍNO 1		VÍNO 2	
	c [ $\mu\text{g.l}^{-1}$ ]	VK [%]	c [ $\mu\text{g.l}^{-1}$ ]	VK [%]
-1	5,97	0,62	5,95	1,76
0	6,11	1,64	6,35	2,76
1	19,44	0,53	13,02	1,41
2	20,36	2,29	16,29	2,76
3	19,65	2,73	17,85	1,94
4	17,21	1,62	18,46	1,48
6	15,85	0,17	19,80	2,25
7	13,64	0,75	19,51	1,90
14	10,11	0,44	19,28	1,07
24	8,27	2,39	16,36	1,01
31	6,76	2,27	12,36	2,12
63	5,28	1,21	9,97	2,88
69	4,79	1,28	5,60	0,49
84	3,10	1,95	4,52	2,49
92	1,47	1,79	2,03	1,94

#### 4.3.2. Výsledky a diskuze stanovení biogenních aminů

Studované vzorky vína byly podrobeny analýze na přítomnost biogenních aminů pomocí iontově-výměnné chromatografie s postkolonovou derivatizací a kolorimetrickou detekcí. Výsledky stanovení jsou shrnuty v tabulkách 31 až 33.

Vzorky vína byly prověřeny na přítomnost histaminu, fenyletylaminu, tyraminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu. Ve vzorcích byly zaznamenány však pouze histamin, putrescin a spermidin. Výsledky obsahu histaminu jsou zobrazeny v tabulce 31.

**Tab. 31** Obsah histaminu ve vzorcích vína z pokusné fáze III

Doba odběru	VÍNO 1		VÍNO 2	
	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
-1	ND	---	ND	---
0	ND	---	ND	---
1	ND	---	ND	---
2	ND	---	ND	---
3	ND	---	ND	---
4	2,432	4,58	ND	---
6	2,635	3,19	ND	---
7	2,919	5,34	ND	---
14	3,029	4,74	ND	---
24	4,369	6,42	ND	---
31	4,922	1,98	ND	---
63	5,360	1,28	ND	---
69	7,334	6,68	ND	---
84	8,547	4,42	ND	---
92	8,630	1,74	ND	---

Jak je patrné, ve vývoji koncentrace histaminu je mezi vzorky vína 1 a 2 zásadní rozdíl. Na počátku pokusu se ani v jednom víně tento amin nevyskytoval. U vína 2 nedošlo k zaznamenání jeho přítomnosti po celou dobu pozorování. U vína 1 se začal vyskytovat 4 DPI a do konce pozorování jeho obsah narůstal, takže při ukončení sledování byla jeho koncentrace přibližně 360 % množství naměřeného 4 DPI.

V tabulce 32 jsou shrnuty výsledky stanovení putrescinu, v tabulce 33 jsou zobrazeny výsledky stanovení spermidinu. U vína 1 je po zaočkování patrný nárůst koncentrace jak putrescinu, tak spermidinu. 3 DPI dosáhla koncentrace putrescinu cca 300 % původního množství, koncentrace spermidinu přibližně 340 % původní koncentrace. Následující vývoj koncentrace studovaných látek měl konstantní charakter, množství ve vzorcích se zvyšovalo až k dosažení maxima při ukončení sledování. U putrescinu to byla koncentrace cca 880 % původního množství, spermidinu cca 890 % původního množství.

**Tab. 32** Obsah putrescinu ve vzorcích vína z pokusné fáze III

Doba odběru	VÍNO 1		VÍNO 2	
	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
-1	1,800	5,01	1,797	2,10
0	4,766	7,34	1,879	6,16
1	4,687	6,15	1,733	4,59
2	5,165	2,61	1,466	6,50
3	5,285	1,81	1,952	5,93
4	5,085	2,65	2,435	4,53
6	5,679	6,05	2,476	1,71
7	5,775	3,37	2,238	5,10
14	5,981	4,99	2,676	6,49
24	6,537	4,05	2,441	3,04
31	11,217	1,80	3,111	2,69
63	11,892	2,37	4,003	1,33
69	12,462	5,43	4,796	3,75
84	13,779	4,26	5,489	6,48
92	15,872	2,00	6,425	3,09

Koncentrace putrescinu a spermidinu ve víně 2 pozvolna narůstala. U putrescinu byla naměřena maximální hodnota při ukončení pokusu, přibližně 360 % původního množství. U spermidinu byla zjištěna maximální hodnota po 69 DPI, a to zhruba 300 % původního množství, poté byl zaznamenán mírný pokles koncentrace a 92 DPI byl obsah spermidinu přibližně 250 % původní koncentrace.

Po provedení statistické analýzy bylo zjištěno, že existuje vysoce významný statistický rozdíl ( $P \leq 0,01$ ) mezi koncentracemi putrescinu a spermidinu v závislosti na použité kultuře pro MLF. Stejně tak existuje vysoce významný statistický rozdíl v celkových sumách biogenních aminů naměřený ve vínech zaočkovaných různými kulturami pro MLF.

Z analyzovaných biogenních aminů byla prokázána přítomnost putrescinu, spermidinu a histaminu. Ostatní studované aminy nebyly prokázány ani ve víně před inokulací, ani v následujících vzorcích. Toto zjištění odpovídá výsledkům jiných autorů [110,120,121]. Z výsledků obsahu putrescinu, spermidinu a histaminu je patrné, že zde existuje významný rozdíl mezi vínem 1 a vínem 2. I když se stanovené koncentrace pohybují hluboko pod koncentracemi, kdy by mohlo dojít k ohrožení zdraví konzumenta, je zde patrný velmi významný rozdíl mezi jednotlivými víny. Velmi zajímavé je, že trend produkce biogenních aminů je u vína 1 je dvojnásobný oproti vínu 2, což lze vysvětlit tím, že mikroorganismy obsažené v kultuře 1 mají vyšší dekarboxylázovou aktivitu než

mikroorganismy v kultuře 2. V našem pokusu sice nedošlo k překročení koncentrací, které by mohly představovat zdravotní riziko pro konzumenta, přesto došlo u vína 1 téměř k devítinásobnému nárůstu obsahu biogenních aminů. Pokud by ve vínu před aplikací kultury pro MLF byly přítomny prekurzory biogenních aminů ve významné koncentraci, k čemuž by mohlo dojít například nedůsledným odkalením vína po hlavním kvašení [2], výsledná koncentrace biogenních aminů by představovala pro konzumenta zdravotní riziko.

**Tab. 33** *Obsah spermidinu ve vzorcích vína z pokusné fáze III*

Doba odběru	VÍNO 1		VÍNO 2	
	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]	c [mg.l <sup>-1</sup> ]	VK [%]
-1	1,383	4,23	1,368	3,17
0	3,351	4,83	1,631	2,10
1	4,942	5,78	1,395	2,44
2	5,675	3,17	1,435	3,31
3	4,857	3,18	1,918	2,41
4	4,264	2,86	2,018	2,06
6	4,253	5,76	2,306	5,51
7	4,723	2,09	2,170	4,04
14	5,269	2,33	2,338	3,26
24	4,312	2,38	2,036	6,27
31	5,817	1,96	1,927	3,94
63	5,766	5,15	2,671	2,77
69	7,217	3,26	4,139	2,70
84	11,025	1,97	4,204	4,92
92	12,486	1,87	3,507	6,48

#### 4.3.3. Výsledky a diskuze stanovení antioxidantů

Pomocí spektrofotometrických technik byla u vzorků vín v pokusné fázi III stanovena celková antioxidační aktivita a celkový obsah polyfenolů. Získaná data jsou zobrazena v tabulkách 34 a 35.

Výsledky stanovení celkového obsahu polyfenolů jsou zobrazeny v tabulce 34. Počáteční hodnota ve vínech před zaočkováním byla přibližně 118 mg GAE.100 ml<sup>-1</sup>. U vína 1 byl zaznamenán nárůst celkového obsahu polyfenolů, 31 DPI byla naměřena hodnota odpovídající přibližně 140 % původního množství. Během následujících odběrů byl zjištěn setrvalý trend, maximální hodnota byla zjištěna 92 DPI (stále přibližně 140 % původního množství). Podobný trend ve vývoji

celkového obsahu polyfenolů byl pozorován u vína 2. 31 DPI byla naměřena hodnota odpovídající přibližně 130 % původního množství, 92 DPI byla naměřena maximální hodnota (stále přibližně 130 % původního množství). Po statistickém porovnání naměřených výsledků celkového obsahu polyfenolů bylo zjištěno, že existuje statisticky významný rozdíl ( $P \leq 0,05$ ) pro hodnoty naměřené ve víně 1 a 2.

**Tab. 34** Celkový obsah polyfenolů ve vzorcích vína z pokusné fáze III

Doba odběru	VÍNO 1		VÍNO 2	
	GAE [mg.100ml <sup>-1</sup> ]	VK [%]	GAE [mg.100ml <sup>-1</sup> ]	VK [%]
-1	117,99	4,69	117,71	3,10
0	122,95	2,11	125,46	4,91
1	127,38	4,22	125,73	5,31
2	132,15	1,34	127,60	3,05
3	136,74	3,88	129,97	1,02
4	142,21	3,41	131,60	1,87
6	145,93	1,39	133,99	5,07
7	153,14	6,19	136,34	1,90
14	157,23	2,80	138,34	4,07
24	162,19	4,35	140,14	6,21
31	163,00	2,59	144,17	4,39
63	164,41	1,64	149,98	3,49
69	164,79	3,60	151,15	3,76
84	165,25	2,16	151,62	2,33
92	165,38	2,53	152,41	4,54

Výsledky měření celkové antioxidační aktivity jsou zobrazeny v tabulce 35. Původní hodnota ve vínech před zaočkováním byla přibližně 18 mg AAE.100 ml<sup>-1</sup>. Po inokulaci došlo ke zvýšení hodnot celkové antioxidační aktivity, která se však dále během celého pokusu příliš neměnila. U vína 1 byla naměřena maximální hodnota 63 DPI, přibližně 105 % původního množství. U vína 2 byla naměřena maximální hodnota 31 DPI, také přibližně 105 % původního množství. Jak je vidět, změny v průběhu pokusu jsou velmi malé. Trend změny celkové antioxidační aktivity v průběhu pokusu je sice statisticky významný ( $P \leq 0,05$ ), avšak tento výpočet může být zatížený chybou danou variačním koeficientem. Původní hodnoty celkového obsahu polyfenolů stanovené ve vínech před inokulací byly sice poměrně nízké, přesto se obdobné hodnoty dají nalézt v odborné literatuře [114]. Nicméně během MLF dochází ke změně těchto hodnot, a to v přímé souvislosti s použitou startérovou kulturou. U obou vín sice

dochází k nárůstu, avšak u vína 1 roste koncentrace strměji. Naměřené hodnoty celkové antioxidační aktivity byly menší než hodnoty nalezené v literatuře [115]. Změna v celkové antioxidační aktivitě, i když je velmi malá, přímo koreluje se změnou celkového obsahu polyfenolů (pro víno 1 je hodnota korelačního koeficientu  $r = 0,98$ , pro víno 2 je  $r = 0,91$ ).

**Tab. 35** Celková antioxidační aktivita ve vzorcích vína z pokusné fáze III

Doba odběru	VÍNO 1		VÍNO 2	
	AAE [mg.100ml <sup>-1</sup> ]	VK [%]	AAE [mg.100ml <sup>-1</sup> ]	VK [%]
-1	18,53	4,11	18,54	3,20
0	18,60	3,97	18,73	3,97
1	18,68	3,90	18,73	3,30
2	18,83	3,87	18,79	4,00
3	18,96	4,56	18,82	2,88
4	19,13	4,34	18,85	3,01
6	19,24	3,39	18,89	3,25
7	19,31	3,48	18,94	4,13
14	19,62	3,57	18,98	3,85
24	19,75	3,46	19,01	3,74
31	19,72	3,65	19,19	4,09
63	19,77	3,93	19,24	4,00
69	19,75	3,64	19,13	3,96
84	19,63	3,45	19,08	3,38
92	19,61	3,31	18,98	3,41

Na závěr této kapitoly budou shrnuty výsledky získané měřením vzorků z pokusné fáze III.

Proměřením vzorků na obsah glyoxalu, metylglyoxalu, diacetylu a pentandionu ukázalo, že existují statisticky velmi významné rozdíly v obsahu diacetylu a metylglyoxalu, statisticky významné rozdíly v obsahu glyoxalu a statisticky nevýznamné rozdíly v obsahu pentandionu. Lze tedy konstatovat, že použitá kultura pro řízenou MLF zásadně ovlivňuje obsah těchto sekundárních metabolitů ve víně. V případě diacetylu u vína 2 došlo dokonce k překročení koncentrace prahu rozpoznatelnosti, proto se tato látka bude podílet na výsledné vůni a chuti vyráběného vína.

U vín byla zjištěna přítomnost putrescinu a spermidinu, u vína 1 navíc i přítomnost histaminu. Zároveň rozdíly v obsahu putrescinu a spermidinu jsou statisticky velmi významné. Lze tedy konstatovat, že i obsah těchto sekundárních metabolitů zásadně ovlivňuje použitá kultura pro řízenou MLF.

Stanovení celkového obsahu polyfenolů a celkové antioxidační aktivity ukázalo, že mezi vzorky vína existuje statisticky významný rozdíl v obou těchto parametrech, i když pro výsledky celkové antioxidační aktivity platí, že zaznamenané změny jsou velmi nízké, až téměř neprůkazné.



## 5 PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

Réva vinná a výrobky z révy vinné, především tedy víno, jsou významnými složkami lidské stravy a výživy. Technologie zpracování hroznů i výroby vína je dynamické odvětví, které podléhá mnoha změnám a neustále se vyvíjí. Sledování parametrů jakosti a zdravotní nezávadnosti se jeví jako velmi účelné a velmi přínosné pro optimální nastavení výrobních procesů i pro kontrolu výrobků.

Přínos pro vědu:

- Stanovení a validace metody stanovení 6 organických kyselin, jejichž množství je v hroznovém víně významné. Tato metoda byla zavedena a v podmínkách laboratoří UTB ve Zlíně je možné nyní standardně stanovovat obsah těchto kyselin v potravinářských matricích.
- Stanovení a validace metody stanovení 4 dikarboxylových sloučenin. Chromatografická metoda byla zavedena v podmínkách laboratoří UTB ve Zlíně a je možné nyní standardně stanovovat obsah těchto sloučenin v potravinářských matricích.
- Posouzení vhodnosti přípravků pro řízenou malolaktickou fermentaci ve víně v závislosti na odrůdě révy vinné. Vhodnost byla sledována za standardních podmínek.
- Získaná data mohou sloužit pro další výzkum v této oblasti, validované metody mohou být dále použity a znalost problematiky se takto bude moci dále prohlubovat.

Přínos pro praxi:

- Na základě výsledků z pokusné fáze II lze shrnout, že komerční prostředek použitý pro řízenou malolaktickou fermentaci způsobil optimální průběh odbourání kyseliny L-jablečné, přičemž nebyla ovlivněna produkce diacetylu. Vliv na produkci biogenních aminů je nejednoznačný. Na celkovou antioxidační aktivitu neměla malolaktická fermentace vliv.
- Na základě výsledků z pokusné fáze III lze shrnout, že použitá komerční kultura je zásadní pro produkci dikarboxylových sloučenin kromě pentandionu, stejně jako na produkci biogenních aminů. Proto je třeba dbát na správný výběr výrobku pro řízenou malolaktickou fermentaci.

## 6 ZÁVĚR

Tato dizertační práce se zabývala markery kvality hroznového vína, biochemickými mechanizmy jejich vzniku a technologickými zákroky ovlivňující jejich množství. Jako základní posuzovaná technologická operace byla určena řízená malolaktická fermentace, metoda biologického odkyselování moštů a vína. Jako markery kvality byly vybrány organické kyseliny, dikarboxylové sloučeniny, biogenní aminy a antioxidanty.

Cíle práce byly rozděleny do 3 etap. Fáze I byl zaměřen na laboratorní analýzy čistých standardů studovaných markerů a byly optimalizovány a validovány metody stanovení jednotlivých sloučenin. Fáze II porovnával vliv řízené malolaktické fermentace způsobené stejným komerčně dostupným přípravkem na vína různých odrůd – Cabernet Moravia a Zweigeltrebe. Fáze III byl zaměřen na sledování rozdílů ve vzorcích vína, které byly na počátku experimentu shodné, zaočkovaných různými komerčně dostupnými preparáty.

Na závěr lze konstatovat, že použité starterové konsorcium bakterií mléčného kvašení významně ovlivňuje obsah sekundárních metabolitů ve vyráběném víně. Tyto změny jsou indikovány rozdílnými kmeny bakterií *Oenococcus oeni* použitých pro výrobu těchto přípravků. Změny ve složení se projevují zejména rozdílnou konečnou koncentrací diacetylu, glyoxalu, metylglyoxalu, putrescinu, spermidinu, histaminu a celkového obsahu polyfenolů. Odlišný je také trend ve vývoji koncentrace těchto látek, zejména diacetylu a metylglyoxalu. Naopak vliv starterové kultury na obsah pentandionu a celkové antioxidační aktivity se neprojevil.

## 7 LITERATURA

- [1] NAŘÍZENÍ RADY (ES) č. 479/2008: o společné organizaci trhu s vínem. In: *Úřední věstník L 148*. 2008.
- [2] JACKSON, Ronald S. *Wine science: principles and applications*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2008. ISBN 978-012-3736-468.
- [3] CARRASCOSA SANTIAGO, Alfonso V, Rosario MUÑOZ a Ramón GONZÁLEZ GARCIA. *Molecular wine microbiology: principles and applications*. 1st. ed. Boston: Elsevier/Academic Press, 2011, vii, 363 p. ISBN 01-237-5021-0.
- [4] ROP, Otakar a Jan HRABĚ. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009, 129 s. ISBN 978-80-7318-748-4.
- [5] HORNSEY, Ian S. *The chemistry and biology of winemaking*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, c2007, xi, 457 p. ISBN 978-085-4042-661.
- [6] NAŘÍZENÍ RADY (ES) č. 1493/1999: o společné organizaci trhu s vínem. In: *Úřední věstník L 179*. 1999.
- [7] MCGOVERN, Patrick E. *Ancient wine: the search for the origins of viticulture*. Princeton: Princeton University Press, c2003, xvi, 365 p. ISBN 06-910-7080-6.
- [8] STYGER, Gustav, Bernard PRIOR a Florian F. BAUER. Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology*. 2011, roč. 38, č. 9, s. 1145-1159. ISSN 1367-5435. DOI: 10.1007/s10295-011-1018-4.
- [9] TOIT, Maret, Lynn ENGELBRECHT, Elda LERM a Sibylle KRIEGER-WEBER. Lactobacillus: the Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures-an Overview. *Food and Bioprocess Technology*. 2011, roč. 4, č. 6, s. 876-906. ISSN 1935-5130.
- [10] TORRIANI, Sandra, Giovanna E. FELIS a Fabio FRACCHETTI. Selection criteria and tools for malolactic starters development: an update. *Annals of Microbiology*. 2011, roč. 61, č. 1, s. 33-39. ISSN 1590-4261.

- [11] PIZARRO, Francisco, Felipe A VARGAS a Eduardo AGOSIN. A systems biology perspective of wine fermentations. *Yeast*. 2007, roč. 24, č. 11, s. 977-991. ISSN 0749503x.
- [12] DE REVEL, G., L. PRIPIS-NICOLAU, J.C. BARBE a A. BERTRAND. The detection of alpha-dicarbonyl compounds in wine by formation of quinoxaline derivatives. *Journal of the science of food and agriculture*. 2000, roč. 80, č. 1, s. 102-108. ISSN 0022-5142.
- [13] BARTOWSKY, Eveline J. a Anthony R. BORNEMAN. Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, roč. 92, č. 3, s. 441-447. ISSN 0175-7598.
- [14] BARTOWSKY, Eveline J. a Paul A. HENSCHKE. The "buttery" attribute of wine - diacetyl - desirability, spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, roč. 96, č. 3, s. 235-252. ISSN 01681605.
- [15] MORENO-ARRIBAS, V., S. TORLOIS, A. JOYEUX, A. BERTRAND a A. LONVAUD-FUNEL. Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. *Journal of Applied Microbiology*. 2000, roč. 88, č. 4, s. 584-593. ISSN 1364-5072.
- [16] KOTANI, Akira, Yuji MIYAGUCHI, Eiji TOMITA, Kiyoko TAKAMURA a Fumiyo KUSU. Determination of Organic Acids by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection during Wine Brewing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, roč. 52, č. 6, s. 1440-1444. ISSN 0021-8561.
- [17] GARRIDO, Jorge a Fernanda BORGES. Wine and grape polyphenols-A chemical perspective. *Food Research International*. 2011, roč. 44, č. 10, s. 3134-3148. ISSN 09639969.
- [18] MANES-LAZARO, R., S. FERRER, A. M. RODAS, M. URDIAIN a I. PARDO. *Lactobacillus bobalius* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from Spanish Bobal grape must. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2008-12-01, roč. 58, č. 12, s. 2699-2703. ISSN 1466-5026.
- [19] MAÑES-LÁZARO, Rosario, Sergi FERRER, Ramón ROSSELLÓ-MORA, Isabel PARDO a I. PARDO. *Lactobacillus uvarum* sp. nov.: A

- new lactic acid bacterium isolated from Spanish Bobal grape must. *Systematic and Applied Microbiology*. 2008, roč. 31, 6-8, s. 425-433. ISSN 07232020.
- [20] MANES-LAZARO, R., S. FERRER, R. ROSSELLO-MORA, I. PARDO a I. PARDO. *Lactobacillus oeni* sp. nov., from wine. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 2009-08-04, roč. 59, č. 8, s. 2010-2014. ISSN 1466-5026.
- [21] EDWARDS, C. G., M. D. COLLINS, P. A. LAWSON a A. V. RODRIGUEZ. *Lactobacillus nagelii* sp nov., an organism isolated from a partially fermented wine. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2000, roč. 50, č. 2, s. 699-702. ISSN 1466-5026.
- [22] RODAS, A. M. *Lactobacillus vini* sp. nov., a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 2006-03-01, roč. 56, č. 3, s. 513-517. ISSN 1466-5026.
- [23] LIU, S. Q. a C. R. DAVIS. ANALYSIS OF WINE CARBOHYDRATES USING CAPILLARY GAS-LIQUID-CHROMATOGRAPHY. *American journal of enology and viticulture*. 1994, roč. 45, č. 2, s. 229-234. ISSN 0002-9254.
- [24] LIU, S. Q., C. R. DAVIS a J. D. BROOKS. GROWTH AND METABOLISM OF SELECTED LACTIC-ACID BACTERIA IN SYNTHETIC WINE. *American journal of enology and viticulture*. 1995, roč. 46, č. 2, s. 166-174. ISSN 0002-9254.
- [25] GUILLOUX-BENATIER, M, O PAGEAULT, A MAN a M FEUILLAT. GROWTH AND METABOLISM OF SELECTED LACTIC-ACID BACTERIA IN SYNTHETIC WINE. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2000-10-1, roč. 25, č. 4, s. 193-197. ISSN 1367-5435.
- [26] RAMOS, A., J. S. LOLKEMA, W. N. KONINGS a H. SANTOS. Enzyme Basis for pH Regulation of Citrate and Pyruvate Metabolism by *Leuconostoc oenos*. *Applied and environmental microbiology AEM*. 1995, roč. 61, č. 4, s. 1303-13010. ISSN 1098-5336.
- [27] RODRÍGUEZ, Héctor, José Antonio CURIEL, José María LANDETE, Blanca DE LAS RIVAS, Félix López DE FELIPE, Carmen GÓMEZ-CORDOVÉS, José Miguel MANCHEÑO a Rosario MUÑOZ. Food

- phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2009, roč. 132, 2-3, s. 79-90. ISSN 01681605.
- [28] REGUANT, C., A. BORDONS, L. AROLA, N. ROZES, Félix López DE FELIPE, Carmen GÓMEZ-CORDOVÉS, José Miguel MANCHEÑO a Rosario MUÑOZ. Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine. *Journal of Applied Microbiology*. 2000, roč. 88, č. 6, s. 1065-1071. ISSN 1364-5072.
- [29] MATO, Inés, Silvia SUÁREZ-LUQUE a José F. HUIDOBRO. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*. 2005, roč. 38, č. 10, s. 1175-1188. ISSN 09639969.
- [30] MIWA, Hiroshi. High-performance liquid chromatographic determination of mono-, poly- and hydroxycarboxylic acids in foods and beverages as their 2-nitrophenylhydrazides. *Journal of Chromatography A*. 2000, roč. 881, 1-2, s. 365-385. ISSN 00219673.
- [31] CAMPUZANO, S., M. GAMELLA, B. SERRA, A. J. REVIEJO a J. M. PINGARRÓN. Integrated Electrochemical Gluconic Acid Biosensor Based on Self-Assembled Monolayer-Modified Gold Electrodes. Application to the Analysis of Gluconic Acid in Musts and Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, roč. 55, č. 6, s. 2109-2114. ISSN 0021-8561.
- [32] XU, Jiming, Yanping WANG, Yuezhong XIAN, Meichuan LIU, Litong JIN a K. TANAKA. Determination of electroinactive organic acids in red wine by ion-exclusion chromatography using a poly-o-phenylenediamine film modified electrode. *Chromatographia*. 2003, roč. 57, 11-12, s. 751-756. ISSN 0009-5893.
- [33] YANG, Wen-Chu, Ai-Min YU, Yi-Qing DAI a Hong-Yuan CHEN. Separation and determination of di- and tricarboxylic acids in fruits by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *Analytica Chimica Acta*. 2000, roč. 415, 1-2, s. 75-81. ISSN 00032670.
- [34] PERES, R.G., E.P. MORAES, G.A. MICKE, F.G. TONIN, M.F.M. TAVARES a D.B. RODRIGUEZ-AMAYA. Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Control*. 2009, roč. 20, č. 6, s. 548-552. ISSN 09567135.

- [35] DE QUIRÓS, A. Rodríguez-Bernaldo, M.A. LAGE-YUSTY a J. LÓPEZ-HERNÁNDEZ. HPLC analysis of organic acids using a novel stationary phase. *Talanta*. 2009-04-30, roč. 78, č. 2, s. 643-646. ISSN 00399140.
- [36] ANLI, R.Ertan, Nilüfer VURAL, Semiramis YILMAZ a Y.Halil VURAL. The determination of biogenic amines in Turkish red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2004, roč. 17, č. 1, s. 53-62. ISSN 08891575.
- [37] LANDETE, J.M., S. FERRER a I. PARDO. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control*. 2007, roč. 18, č. 12, s. 1569-1574. ISSN 09567135.
- [38] VIDAL-CAROU, M.Carmen, Fedra LAHOZ-PORTOLÉS, Sara BOVERCID a Abel MARINÉ-FONT. Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines and polyamines in wine and other alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*. 2003, roč. 998, 1-2, s. 235-241. ISSN 00219673.
- [39] MARTÍN-ÁLVAREZ, Pedro J., Ángela MARCOBAL, Carmen POLO a M. Victoria MORENO-ARRIBAS. Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wines. *European Food Research and Technology*. 2006, roč. 222, 3-4, s. 420-424. ISSN 1438-2377.
- [40] SOUFLEROS, E.H., E. BOULOUMPASI, A. ZOTOU a Z. LOUKOU. Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. *Food Chemistry*. 2007, roč. 101, č. 2, s. 704-716. ISSN 03088146.
- [41] GONZÁLEZ MARCO, Ana a Carmen ANCÍN AZPILICUETA. Amine concentrations in wine stored in bottles at different temperatures. *Food Chemistry*. 2006, roč. 99, č. 4, s. 680-685. ISSN 03088146.
- [42] LANDETE, José María, Isabel PARDO a Sergi FERRER. Tyramine and phenylethylamine production among lactic acid bacteria isolated from wine. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, roč. 115, č. 3, s. 364-368. ISSN 01681605.
- [43] MORENO-ARRIBAS, M.Victoria, M.Carmen POLO, Felisa JORGANES a Rosario MUÑOZ. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, roč. 84, č. 1, s. 117-123. ISSN 01681605.

- [44] MANGANI, Silvia, Simona GUERRINI, Lisa GRANCHI a Massimo VINCENZINI. Putrescine Accumulation in Wine: Role of *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology*. 2005, roč. 51, č. 1, s. 6-10. ISSN 0343-8651.
- [45] LANDETE, J.M., S. FERRER a I. PARDO. *Journal of Applied Microbiology*. 2005, roč. 99, č. 3, s. 580-586. ISSN 1364-5072.
- [46] LANDETE, José M., Isabel PARDO a Sergi FERRER. Histamine, histidine, and growth-phase mediated regulation of the histidine decarboxylase gene in lactic acid bacteria isolated from wine. *FEMS Microbiology Letters*. 2006, roč. 260, č. 1, s. 84-90. ISSN 03781097.
- [47] JIMÉNEZ MORENO, Nerea, Diego TORREA GOÑI a Carmen ANCÍN AZPILICUETA. Changes in Amine Concentrations during Aging of Red Wine in Oak Barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, roč. 51, č. 19, s. 5732-5737. ISSN 0021-8561.
- [48] LANDETE, José M., Sergi FERRER, Lucía POLO a Isabel PARDO. Biogenic Amines in Wines from Three Spanish Regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, roč. 53, č. 4, s. 1119-1124. ISSN 0021-8561.
- [49] GARCÍA-VILLAR, Natividad, Santiago HERNÁNDEZ-CASSOU a Javier SAURINA. Characterization of Wines through the Biogenic Amine Contents Using Chromatographic Techniques and Chemometric Data Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, roč. 55, č. 18, s. 7453-7461. ISSN 0021-8561.
- [50] PRAMATEFTAKI, P.V., M. METAFA, S. KALLITHRAKA a P. LANARIDIS. Evolution of malolactic bacteria and biogenic amines during spontaneous malolactic fermentations in a Greek winery. *Letters in Applied Microbiology*. 2006, roč. 43, č. 2, s. 155-160. ISSN 0266-8254.
- [51] MARCOBAL, A., M.C. POLO, P.J. MARTÍN-ÁLVAREZ a M.V. MORENO-ARRIBAS. Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food Research International*. 2005, roč. 38, č. 4, s. 387-394. ISSN 09639969.
- [52] GONZÁLEZ-MARCO, Ana a Carmen ANCÍN-AZPILICUETA. Influence of Lees Contact on Evolution of Amines in Chardonnay Wine.



- Journal of Food Science*. 2006, roč. 71, č. 9, C544-C548. ISSN 0022-1147.
- [53] BOVERCID, S, M IQUIERDOPULIDO, A MARINEFONT a M VIDALCAROU. Biogenic mono-, di- and polyamine contents in Spanish wines and influence of a limited irrigation. *Food Chemistry*. 2006, roč. 96, č. 1, s. 43-47. ISSN 03088146.
- [54] HERNÁNDEZ-ORTE, P., A.C. LAPEÑA, A. PEÑA-GALLEGO, J. ASTRAIN, C. BARON, I. PARDO, L. POLO, S. FERRER, J. CACHO a V. FERREIRA. Biogenic amine determination in wine fermented in oak barrels: Factors affecting formation. *Food Research International*. 2008, roč. 41, č. 7, s. 697-706. ISSN 09639969.
- [55] ANCÍN-AZPILICUETA, Carmen, Ana GONZÁLEZ-MARCO. Current Knowledge about the Presence of Amines in Wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008-02-19, roč. 48, č. 3, s. 257-275. ISSN 1040-8398.
- [56] ROSI, Iolanda, Francesca NANNELLI a Giovanna GIOVANI. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation of wines obtained using different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT - Food Science and Technology*. 2009, roč. 42, č. 2, s. 525-530. ISSN 00236438.
- [57] ÖZDESTAN, Özgül a Ali ÜREN. A method for benzoyl chloride derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography. *Talanta*. 2009-06-15, roč. 78, 4-5, s. 1321-1326. ISSN 00399140.
- [58] XIAO, Zijun a Ping XU. Acetoin Metabolism in Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*. 2007, roč. 33, č. 2, s. 127-140. ISSN 1040-841x.
- [59] CHEN, Yong, Robert E. SHIREY a Leonard M. SIDISKY. Determination of Diacetyl in Butter and Air Samples by SPME Coupled with GC/MS. *Chromatographia*. 2010, roč. 72, 9-10, s. 999-1004. ISSN 0009-5893.
- [60] TIAN, Jiyuan. Determination of several flavours in beer with headspace sampling-gas chromatography. *Food Chemistry*. 2010, roč. 123, č. 4, s. 1318-1321. ISSN 03088146.

- [61] LUES, J.F.R., W.C. BOTHA a E.J. SMIT. Ion-exchange HPLC of Cheese-related Organic Acids in Comparison with Reverse-phase HPLC. *International Dairy Journal*. 1998, roč. 8, č. 12, s. 959-965. ISSN 09586946.
- [62] ZEPPA, Giuseppe, Lorenza CONTERNO a Vincenzo GERBI. Determination of Organic Acids, Sugars, Diacetyl, and Acetoin in Cheese by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, roč. 49, č. 6, s. 2722-2726. ISSN 0021-8561.
- [63] ZHENG, Yan-Jun, Yun-Tao DUAN, Yan-Fang ZHANG, Qiu-Hong PAN, Jing-Ming LI a Wei-Dong HUANG. Determination of Organic Acids in Red Wine and Must on Only One RP-LC-Column Directly After Sample Dilution and Filtration. *Chromatographia*. 2009, roč. 69, 11-12, s. 1391-1395. ISSN 0009-5893.
- [64] OLIVER, Christine M., Laurence D. MELTON a STANLEY. Creating Proteins with Novel Functionality via the Maillard Reaction: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2006, roč. 46, č. 4. ISSN 1040-8398.
- [65] XUE, Mingzhan, Naila RABBANI a Paul J. THORNALLEY. Glyoxalase in ageing. *Seminars in Cell*. 2011, roč. 22, č. 3, s. 293-301. ISSN 10849521.
- [66] RABBANI, Naila Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders. *Seminars in Cell*. 2011, roč. 22, č. 3, s. 309-317. ISSN 10849521.
- [67] THORNALLEY, Paul J. a Naila RABBANI. Glyoxalase in tumourigenesis and multidrug resistance. *Seminars in Cell*. 2011, roč. 22, č. 3, s. 318-325. ISSN 10849521.
- [68] PRICE, Claire L. a Stella C. KNIGHT. Methylglyoxal: possible link between hyperglycaemia and immune suppression?. *Trends in Endocrinology*. 2009, roč. 20, č. 7, s. 312-317. ISSN 10432760.
- [69] NEMET, Ina, Lidija VARGA-DEFTERDAROVIĆ a Zdenka TURK. Methylglyoxal in food and living organisms. *Molecular Nutrition*. 2006, roč. 50, č. 12, s. 1105-1117. ISSN 16134125.
- [70] DESAI, Kaushik M., Tuanjie CHANG, Hui WANG, Ali BANIGESH, Arti DHAR, Jianghai LIU, Ashley UNTEREINER a Lingyun WU. Oxidative stress and aging: Is methylglyoxal the hidden enemy? This

review is one of a selection of papers published in a Special Issue on Oxidative Stress in Health and Disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2010, roč. 88, č. 3, s. 273-284. ISSN 0008-4212.

- [71] MITTELMAIER, Stefan, Toshimitsu NIWA a Monika PISCHETSRIEDER. Chemical and Physiological Relevance of Glucose Degradation Products in Peritoneal Dialysis. *Journal of Renal Nutrition*. 2012, roč. 22, č. 1, s. 181-185. ISSN 10512276.
- [72] HENLE, T. Protein-bound advanced glycation endproducts (AGEs) as bioactive amino acid derivatives in foods. *Amino Acids*. 2005, roč. 29, č. 4, s. 313-322. ISSN 0939-4451.
- [73] KOVACIC, Peter a Andrew L. COOKSY. Role of diacetyl metabolite in alcohol toxicity and addiction via electron transfer and oxidative stress. *Archives of Toxicology*. 2005, roč. 79, č. 3, s. 123-128. ISSN 0340-5761.
- [74] KALAPOŠ, Miklós Péter. The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chemico-Biological Interactions*. 2008, roč. 171, č. 3, s. 251-271. ISSN 00092797.
- [75] RODRIGUES, J. A., A. A. BARROS a P. G. RODRIGUES. Differential Pulse Polarographic Determination of alpha-Dicarbonyl Compounds in Foodstuffs after Derivatization with o-Phenylenediamine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, roč. 47, č. 8, s. 3219-3222. ISSN 0021-8561.
- [76] OLIVEIRA, Carla Maria, António César Silva FERREIRA, Victor DE FREITAS a Artur M. S. SILVA. Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*. 2011, roč. 44, č. 5, s. 1115-1126. ISSN 09639969.
- [77] GOLDBERG, David M a George J SOLEAS. Wine and Health: A Paradigm for Alcohol and Antioxidants. *Journal of Medical Biochemistry*. 2011-1-1, roč. 30, č. 2, s. 93-102. ISSN 1452-8258.
- [78] GUILFORD, J. M. a J. M. PEZZUTO. Wine and Health: A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2011-12-01, roč. 62, č. 4, s. 471-486. ISSN 0002-9254.
- [79] VISLOCKY, Lisa M a Maria Luz FERNANDEZ. Biomedical effects of grape products. *Nutrition Reviews*. 2010, roč. 68, č. 11, s. 656-670. ISSN 00296643.

- [80] ZHU, Lei, Yali ZHANG a Jiang LU. Phenolic Contents and Compositions in Skins of Red Wine Grape Cultivars among Various Genetic Backgrounds and Originations. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012, roč. 13, č. 3, s. 3492-3510. ISSN 1422-0067.
- [81] ZHU, Lei, Yali ZHANG, Jiajin DENG, Huirong LI a Jiang LU. Phenolic Concentrations and Antioxidant Properties of Wines Made from North American Grapes Grown in China. *Molecules*. 2012, roč. 17, č. 3, s. 3304-3323. ISSN 1420-3049.
- [82] GRANATO, Daniel, Flávia Chizuko UCHIDA KATAYAMA a Inar Alves DE CASTRO. Characterization of red wines from South America based on sensory properties and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2012, roč. 92, č. 3, s. 526-533. ISSN 00225142.
- [83] ARAUJO, André R. T. S., Fernando MAYA, M. Lúcia M. F. S. SARAIVA, José L. F. C. LIMA, José M. ESTELA a Víctor CERDÀ. Flow system for the automatic screening of the effect of phenolic compounds on the luminol-hydrogen peroxide-peroxidase chemiluminescence system. *Luminescence*. 2011, roč. 26, č. 6, s. 571-578. ISSN 15227235.
- [84] TENORE, Gian Carlo, Adriana BASILE a Ettore NOVELLINO. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Polyphenolic Fractions from Selected Moroccan Red Wines. *Journal of Food Science*. 2011, roč. 76, č. 9, C1342-C1348. ISSN 00221147.
- [85] ABRAHAMSE, Caroline E. a Eveline J. BARTOWSKY. Timing of malolactic fermentation inoculation in Shiraz grape must and wine: influence on chemical composition. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012, roč. 28, č. 1, s. 255-265. ISSN 0959-3993.
- [86] SNEDECOR, George W. a William G. COCHRAN. *Statistical methods*. 8 ed. Ames, Iowa: Iowa State Univ. Press, 1994. ISBN 978-081-3815-619.
- [87] GHASSEMPOUR, Alireza, Nahid Mashkouri NAJAFI a Ali Asghar AMIRI. Determination of citric acid in fermentation media by pyrolysis mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 2003, roč. 70, č. 2, s. 251-261. ISSN 01652370.

- [88] KENNEY, Beverly F. Determination of organic acids in food samples by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1991, roč. 546, č. 1, s. 423-430. ISSN 00219673.
- [89] MATO, Inés, Silvia SUÁREZ-LUQUE a José F. HUIDOBRO. Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection. *Food Chemistry*. 2007, roč. 102, č. 1, s. 104-112. ISSN 03088146.
- [90] SHUKLA, Shruti, Tae Bong CHOI, Hae-Kyong PARK, Myunghee KIM, In Koo LEE a Jong-Kyu KIM. Determination of non-volatile and volatile organic acids in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang). *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2010, roč. 48, 8-9. ISSN 0278-6915.
- [91] RODRIGUES, Pedro G., José A. RODRIGUES, Aquiles A. BARROS, Rui A. S. LAPA, José L. F. C. LIMA, J. M. MACHADO CRUZ a A. A. FERREIRA. Automatic Flow System with Voltammetric Detection for Diacetyl Monitoring during Brewing Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, roč. 50, č. 13, s. 3647-3653. ISSN 0021-8561.
- [92] MARTINEAU, Brigitte, Terry ACREE a Thomas HENICK-KLING. A simple and accurate GC/MS method for the quantitative analysis of diacetyl in beer and wine. *Biotechnology Techniques*. 1994, roč. 8, č. 1, s. -. ISSN 0951-208x
- [93] PURETSKII, N. A., M. A. PROSKURNIN a A. V. PIROGOV. Determination of diacetyl with spectrophotometry and thermal-lens spectrometry. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2009, roč. 64, č. 2, s. 93-98. ISSN 0027-1314.
- [94] GARCÍA-VILLANOVA, Rafael J. a Rosa M. GARCÍA ESTEPA. Fluorimetric determination of diacetyl and 2,3-pentanedione with isoniazide and a zirconium salt. *Talanta*. 1993, roč. 40, č. 9, s. 1419-1423. ISSN 00399140.
- [95] HAYASAKA, Yoji a Eveline J. BARTOWSKY. Analysis of Diacetyl in Wine Using Solid-Phase Microextraction Combined with Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, roč. 47, č. 2, s. 612-617. ISSN 0021-8561.

- [96] SMĚLÁ, Dana, Pavla PECHOVÁ, Tomáš KOMPRDA, Bořivoj KLEJDUS a Vlastimil KUBÁŇ. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy*. 2004, roč. 98, č. 7, s. 432-437. ISSN 1213-7103.
- [97] BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Pavlína KLČOVSKÁ, Vladimír MRKVIČKA, Magda DOLEŽALOVÁ a Stanislav KRÁČMAR. Formation of biogenic amines by Gram-negative bacteria isolated from poultry skin. *Food Chemistry*. 2010, roč. 121, č. 1, s. 203-206. ISSN 03088146.
- [98] SUN, Xiuhua, Xiurong YANG a Erkang WANG. Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*. 2003, roč. 1005, 1-2, s. 189-195. ISSN 00219673.
- [99] PINEDA, Renan, Allen D. KNAPP, John C. HOEKSTRA a Dennis C. JOHNSON. Integrated square-wave electrochemical detection of biogenic amines in soybean seeds following their separations by liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 2001, roč. 449, 1-2, s. 111-117. ISSN 00032670.
- [100] FERNANDES, J. O. a M. A. FERREIRA. Combined ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in Port wine and grape juice. *Journal of Chromatography A*. 2000, roč. 886, 1-2, s. 183-195. ISSN 00219673.
- [101] ROP, Otakar, Tunde JURÍKOVÁ, Jiří MLČEK, Daniela KRAMÁŘOVÁ a Zoltsetseg SENGEE. Antioxidant activity and selected nutritional values of plums (*Prunus domestica* L.) typical of the White Carpathian Mountains. *Scientia Horticulturae*. 2009, roč. 122, č. 4, s. 545-549. ISSN 03044238.
- [102] BALÍK, Josef, Marie KYSELÁKOVÁ, Jan TRÍSKA, Naděžda VRCHOTOVÁ, Jaromír VEVERKA, Pavel HÍC, Jiří TOTUŠEK a Danuše LEFNEROVÁ. The Changes of Selected Phenolic Substances In Wine Technology. *Czech Journal of Food Sciences*. Praha: Česká akademie zemědělských věd, 2008, roč. 26, Spec., S1-S12. ISSN 1212-1800.

- [103] PAPOUŠKOVÁ, Barbora, Petr BEDNÁŘ, Karel HRON, Jan STÁVEK, Josef BALÍK, Renáta MYJAVCOVÁ, Petr BARTÁK, Eva TOMÁNKOVÁ a Karel LEMR. Advanced liquid chromatography/mass spectrometry profiling of anthocyanins in relation to set of red wine varieties certified in Czech Republic. *Journal of Chromatography A*. 2011, roč. 1218, č. 42, s. 7581-7591. ISSN 00219673.
- [104] SOYOLKHAM, Badamtsetseg, Pavel VALÁŠEK, Miroslav FIŠERA, Vlastimil FIC, Vlastimil KUBÁŇ a Ignác HOZA. Total polyphenolic compounds contents (TPC), total antioxidant activities (TAA) and HPLC determination of individual polyphenolic compounds in selected Moravian and Austrian wines. *Central European Journal of Chemistry*. 2011, roč. 9, č. 4, s. 677-687. ISSN 1895-1066.
- [105] STRATIL, Pavel, Vlastimil KUBÁŇ a Jitka FOJTOVÁ. Comparison of the Phenolic Content and Total Antioxidant Activity in Wines as Determined by Spectrophotometric Methods. *Czech Journal of Food Sciences*. Praha: Česká akademie zemědělských věd, 2008, roč. 26, č. 4, s. 242-253. ISSN 1212-1800.
- [106] ROP, Otakar, Vojtěch ŘEZNÍČEK, Magdalena VALŠÍKOVÁ, Tunde JURÍKOVÁ, Jiří MLČEK a Daniela KRAMÁŘOVÁ. Antioxidant Properties of European Cranberrybush Fruit (*Viburnum opulus* var. *edule*). *Molecules*. 2010, roč. 15, č. 6, s. 4467-4477. ISSN 1420-3049.
- [107] MARCHAND, Stéphanie, Gilles DE REVEL a Alain BERTRAND. Approaches to Wine Aroma: Release of Aroma Compounds from Reactions between Cysteine and Carbonyl Compounds in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, roč. 48, č. 10, s. 4890-4895. ISSN 0021-8561.
- [108] LÓPEZ, Rosa, Isabel LÓPEZ-ALFARO, Ana Rosa GUTIÉRREZ, Carmen TENORIO, Patrocinio GARIJO, Lucía GONZÁLEZ-ARENZANA a Pilar SANTAMARÍA. Malolactic fermentation of Tempranillo wine: contribution of the lactic acid bacteria inoculation to sensory quality and chemical composition. *International Journal of Food Science*. 2011, roč. 46, č. 11, s. 2373-2381. ISSN 09505423.
- [109] LUCAS, P. M., O. CLAISSE a A. LONVAUD-FUNEL. High Frequency of Histamine-Producing Bacteria in the Enological Environment and Instability of the Histidine Decarboxylase Production Phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008-02-01, roč. 74, č. 3, s. 811-817. ISSN 0099-2240.

- [110] PATRIGNANI, F., M. NDAGIJIMANA, N. BELLETTI, F. GARDINI, P. VERNOCCHI a R. LANCIOTTI. Biogenic Amines and Ethyl Carbamate in Primitivo Wine: Survey of Their Concentrations in Commercial Products and Relationship with the Use of Malolactic Starter. *Journal of Food Protection*. 2012-03-01, roč. 75, č. 3, s. 591-596. ISSN 0362028x.
- [111] DEEPIKA PRIYADARSHANI, Wadu Mesthri a Sudip K. RAKSHIT. Screening selected strains of probiotic lactic acid bacteria for their ability to produce biogenic amines (histamine and tyramine). *International Journal of Food Science*. 2011, roč. 46, č. 10, s. 2062-2069. ISSN 09505423.
- [112] YILDIRIM, Hatice K., Yasemin D. AKCAY, Ulgar GUVENC, Ahmet ALTINDISLI a Eser Y. SOZMEN. Antioxidant activities of organic grape, pomace, juice, must, wine and their correlation with phenolic content. *International Journal of Food Science and Technology*. 2005, roč. 40, č. 2, s. 133-142. ISSN 0950-5423.
- [113] MILDNER-SZKUDLARZ, Sylwia, Renata ZAWIRSKA-WOJTASIAK, Artur SZWENGIEL a Mariusz PACYŃSKI. Use of grape by-product as a source of dietary fibre and phenolic compounds in sourdough mixed rye bread. *International Journal of Food Science*. 2011, roč. 46, č. 7, s. 1485-1493. ISSN 09505423.
- [114] BURIN, Vivian Maria, Leila Denise FALCÃO, Eduardo S. CHAVES, Eliana Fortes GRIS, Luana Floriani PRETI a Marilde T. BORDIGNON-LUIZ. Phenolic composition, colour, antioxidant activity and mineral profile of Cabernet Sauvignon wines. *International Journal of Food Science*. 2010, roč. 45, č. 7, s. 1505-1512. ISSN 09505423.
- [115] BRANDOLINI, Vincenzo, Concetta FIORE, Annalisa MAIETTI, Paola TEDESCHI a Patrizia ROMANO. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strains on wine total antioxidant capacity evaluated by photochemiluminescence. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2007-3-21, roč. 23, č. 4, s. 581-586. ISSN 0959-3993.
- [116] MARCHAND, Stéphanie, John ALMY a Gilles DE REVEL. The Cysteine Reaction with Diacetyl under Wine-Like Conditions: Proposed Mechanisms for Mixed Origins of 2-Methylthiazole, 2-Methyl-3-thiazoline, 2-Methylthiazolidine, and 2,4,5-Trimethyloxazole. *Journal of Food Science*. 2011, roč. 76, č. 6, C861-C868. ISSN 00221147.



- [117] YE, Haiqing, Yutian MIAO, Chengcheng ZHAO a Yuan YUAN. Acrylamide and methylglyoxal formation in potato chips by microwaving and frying heating. *International Journal of Food Science*. 2011, roč. 46, č. 9, s. 1921-1926. ISSN 09505423.
- [118] FLAMINI, Riccardo a Antonio DALLA VEDOVA. Glyoxal/ Glycolaldehyde: A Redox System Involved in Malolactic Fermentation of Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, roč. 51, č. 8, s. 2300-2303. ISSN 0021-8561.
- [119] ARRIBAS-LORENZO, Gema a Francisco J. MORALES. Analysis, Distribution, and Dietary Exposure of Glyoxal and Methylglyoxal in Cookies and Their Relationship with Other Heat-Induced Contaminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010-03-10, roč. 58, č. 5, s. 2966-2972. ISSN 0021-8561.
- [120] UGLIANO, Maurizio, Alessandro GENOVESE a Luigi MOIO. Hydrolysis of Wine Aroma Precursors during Malolactic Fermentation with Four Commercial Starter Cultures of *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, roč. 51, č. 17, s. 5073-5078. ISSN 0021-8561.
- [121] AI, Amit Kumar, Maya PRAKASH a K. A. ANU APPAIAH. Production of Garcinia wine: changes in biochemical parameters, organic acids and free sugars during fermentation of Garcinia must. *International Journal of Food Science*. 2010, roč. 45, č. 7, s. 1330-1336. ISSN 09505423.

## 8 SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

### Články v recenzovaných časopisech

ADAM, Vojtěch, Radka MIKELOVÁ, Jaromír HUBÁLEK, Pavel HANUŠTIAK, Miroslava BEKLOVÁ, Petr HODEK, Aleš HORNA, Libuše TRNKOVÁ, Marie STIBOROVÁ, Ladislav ZEMAN a René KIZEK. Utilizing of Square Wave Voltammetry to Detect Flavonoids in the Presence of Human Urine. *Sensors*. 2007, roč. 7, č. 10, s. 2402-2418. ISSN 1424-8220.

ADAM, Vojtěch, Pavel HANUŠTIAK, Soňa KŘÍŽKOVÁ, Miroslava BEKLOVÁ, Josef ZEHNÁLEK, Libuše TRNKOVÁ, Aleš HORNA, Bernd SURES, Ladislav ZEMAN a René KIZEK. Palladium Biosensor. *Electroanalysis*. 2007, roč. 19, č. 18, s. 1909-1914. ISSN 10400397.

ŠUPÁLKOVÁ, Veronika, Dalibor HÚSKA, Václav DIOPAN, Pavel HANUŠTIAK, Ondřej ZÍTKA, Karel STEJSKAL, Jiří BALOUN, Jiří PIKULA, Ladislav HAVEL, Josef ZEHNÁLEK, Vojtěch ADAM, Libuše TRNKOVÁ, Miroslava BEKLOVÁ a René KIZEK. Electroanalysis of Plant Thiols. *Sensors*. 2007, roč. 7, č. 6, s. 932-959. ISSN 1424-8220.

MIKELOVÁ, Radka, Petr HODEK, Pavel HANUŠTIAK, Vojtěch ADAM, Soňa KŘÍŽKOVÁ, Ladislav HAVEL, Marie STIBOROVÁ, Aleš HORNA, Miroslava BEKLOVÁ, Libuše TRNKOVA a René KIZEK. Determination of isoflavones using liquid chromatography with electrochemical detection. *Acta chimica Slovenica*. 2007, roč. 54, č. 1, s. 92-97. ISSN 1318-0207.

HODEK, Petr, Pavel HANUŠTIAK, Jitka KŘÍŽKOVÁ, Radka MIKELOVÁ, Soňa KŘÍŽKOVÁ, Marie STIBOROVÁ, Libuše TRNKOVÁ, Aleš HORNA, Miroslava BEKLOVÁ a René KIZEK. Toxicological aspects of flavonoid interaction with biomacromolecules. *Neuroendocrinology letters*. 2006, roč. 27, č. 2, s. 14-17. ISSN 0172-780x.

BABULA, Petr, Dalibor HÚSKA, Pavel HANUŠTIAK, Jiří BALOUN, Soňa KŘÍŽKOVÁ, Vojtěch ADAM, Jaromír HUBÁLEK, Ladislav HAVEL, Milan ŽEMLIČKA, Aleš HORNA, Miroslava BEKLOVÁ a René KIZEK. Flow Injection Analysis Coupled with Carbon Electrodes as the Tool for Analysis of Naphthoquinones with Respect to Their Content and Functions in Biological Samples. *Sensors*. 2006, roč. 6, č. 11, s. 1466-1482. ISSN 1424-8220.

**Články spojené se studiem na UTB ve Zlíně**

HANUŠTIAK, Pavel, Miroslav HORÁK, Josef BALÍK a Jan HRABĚ. Content changes of selected secondary metabolites in semi-finished wine products in addition on various strains for malolactic fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*. **SUBMITTED**

HANUŠTIAK, Pavel, Josef BALÍK a Jan HRABĚ. Řízené jablečno-mléčné kvašení vína a jeho vliv na chemické složení výrobku. *Výživa a potraviny*. 2013, r. 68, č. 2. **ACCEPTED**

## 9 CV AUTORA

### OSOBNÍ ÚDAJE

<i>Jméno a příjmení</i>	<b>Ing. PAVEL HANUŠTIAK</b>
<i>Bydliště</i>	Šibeňák 1459, 755 01 Vsetín
<i>E-mail</i>	hanustiak@ft.utb.cz
<i>Národnost</i>	česká
<i>Datum narození</i>	26. 12. 1982

### VZDĚLÁNÍ

2008 – dosud	doktorské studium v oboru Technologie potravin Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická
2001 – 2006	Ing. Obor: Technologie potravin Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Fakulta agronomická
1994 – 2001	maturita Masarykovo gymnázium Vsetín

### DOVEDNOSTI

<i>Jazykové znalosti</i>	Anglický jazyk – aktivně - pokročile Německý jazyk – pasivně
<i>Práce s PC</i>	Znalost MS Office (Word, Excel, Powerpoint, Outlook)
<i>Řidičský průkaz</i>	skupiny B