

Chromatografické a enzymatické stanovení glukózy a fruktózy v červených a bílých vínech

Bc. Zuzana Švajdová

Diplomová práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav analýzy a chemie potravin
akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Zuzana Švajdová**
Osobní číslo: **T11577**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Chromatografické a enzymatické stanovení glukózy a fruktózy v červených a bílých vínech**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část:

- 1. Charakteristika révy vinné a vybraných odrůd červených a bílých vín**
- 2. Popis chemického složení vína**
- 3. Popis technologie výroby vína**
- 4. Přehled metod použitých pro stanovení sacharidů ve víně**

Praktická část:

- 1. Stanovení glukózy a fruktózy ve vzorcích červených a bílých vín pomocí techniky HPLC s RID detekcí**
- 2. Stanovení glukózy a fruktózy ve vzorcích vína enzymaticky**
- 3. Porovnání výsledků měření a metod použitých pro stanovení sacharidů ve víně**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. STEIDL, R. Sklepní hospodářství. Valtice: Národní salón vín, 2002. 307 s. ISBN 80-903201-0-4.
item KRAUS, V., HUBÁČEK, V., ACKERMANN, P. Rukověť vinaře, Praha 2000, ISBN 80-209-0286-4.
2. RANKINE, B. Making good wine. Australia: Macmillan, 2004. 318 s. ISBN 1-4050-3601.
3. VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. Chemie potravin I. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
4. MINÁRIK, E., NAVARA, A. Chémia a mikrobiológia vína. Bratislava, 1986, 560 s.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Soňa Škrovánková, Ph.D.

Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání diplomové práce:

11. února 2013

Termín odevzdání diplomové práce:

17. května 2013

Ve Zlíně dne 11. února 2013



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.

děkan



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.

ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Bc. Švajdová Zuzana

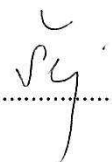
Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 1.5.2013


.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

V teoretické části diplomové práce je charakterizována réva vinná a vybrané odrůdy červených a bílých vín, popis chemického složení vína včetně jednotlivých technologických kroků jeho výroby a metodami stanovení sacharidů ve víně. Experimentální část je zaměřena na stanovení glukózy a fruktózy v 15 vybraných vzorcích červených a bílých vín pomocí HPLC s RID detekcí a enzymatickým stanovením.

Klíčová slova: víno, glukóza, fruktóza, HPLC/RID, enzymatické stanovení

ABSTRACT

In the theoretical part of the thesis the grapevine and selected varieties of red and white wines are characterized. The description of the chemical composition of wine including production processes and methods of carbohydrates determination in wine is done. The experimental part focuses on the determination of glucose and fructose in 15 selected samples of red and white wines using HPLC with RID detection and enzymatic assessment.

Keywords: wine, glucose, fructose, HPLC/RID, enzymatic determination

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce Ing. Soni Škrovánkové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady a připomínky, které mi pomohly při vypracování této práce.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Marceli Olbrechtové a vedení firmy Zámecké vinařství Bzenec s.r.o. za poskytnutí materiálů k řešené problematice a prostoru k vykonání praktické části práce.

V neposlední řadě patří mé poděkování celé mé rodině za podporu, kterou mi při studiu poskytli.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 CHARAKTERISTIKA RÉVY VINNÉ A VYBRANÝCH ODRŮD ČERVENÝCH A BÍLÝCH VÍN	12
1.1 POPIS RÉVY VINNÉ.....	12
1.1.1 Hrozny révy vinné	12
1.1.1.1 Bobule.....	13
1.1.1.2 Slupka bobule	14
1.1.1.3 Dužnina.....	14
1.1.1.4 Semena.....	14
1.1.2 Zrání hroznů	15
1.2 VYBRANÉ ODRŮDY BÍLÝCH VÍN.....	15
1.3 VYBRANÉ ODRŮDY ČERVENÝCH VÍN	19
2 POPIS CHEMICKÉHO SLOŽENÍ VÍNA	21
2.1 VODA	21
2.2 SACHARIDY	22
2.2.1 Fyzikální a chemické vlastnosti monosacharidů	23
2.2.2 Glukóza	23
2.2.3 Fruktóza.....	24
2.2.4 Sacharóza	24
2.2.5 Další sacharidy	24
2.3 KYSELINY.....	25
2.4 DUSÍKATÉ LÁTKY	26
2.5 ALKOHOLY	26
2.6 TŘÍSLOVINY.....	27
2.7 AROMATICKÉ LÁTKY	27
2.8 MINERÁLNÍ PRVKY	29
2.9 VITAMINY	29
2.10 BARVIVA	30
2.11 DALŠÍ SLOŽKY VÍNA	31
3 TECHNOLOGIE VÝROBY VÍNA	32
3.1 ÚPRAVA MOŠTU	33
3.2 FERMENTACE	34
3.3 ŠKOLENÍ A OŠETŘOVÁNÍ VÍN.....	36
3.4 LAHVOVÁNÍ.....	38
4 METODY STANOVENÍ SACHARIDŮ VE VÍNĚ	39

4.1	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC).....	39
4.1.1	Chromatograf HPLC	39
4.1.2	Stacionární fáze	43
4.1.3	Mobilní fáze	43
4.2	ENZYMATICKÉ STANOVENÍ.....	43
II	PRAKTICKÁ ČÁST	46
5	CÍL PRÁCE	47
6	MATERIÁL A PŘÍSTROJE.....	48
6.1	PŘÍSTROJE A POMŮCKY	48
6.2	CHEMIKÁLIE, REFERENČNÍ A JINÉ MATERIÁLY	49
7	METODIKA STANOVENÍ.....	50
7.1	STANOVENÍ SACHARIDŮ POMOCÍ HPLC S RID DETEKČÍ.....	50
7.2	STANOVENÍ SACHARIDŮ ENZYMATICKY	51
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	53
8.1	STANOVENÍ GLUKÓZY A FRUKTÓZY TECHNIKOU HPLC-RID.....	53
8.1.1	Kalibrační křivka glukózy	53
8.1.2	Kalibrační křivka fruktózy	54
8.1.3	Výsledky stanovení technikou HPLC s RID detekcí.....	56
8.2	ENZYMATICKÉ STANOVENÍ GLUKÓZY A FRUKTÓZY	58
8.3	SROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ STANOVENÍ GLUKÓZY A FRUKTÓZY METODOU HPLC- RID A ENZYMATICKY	61
8.3.1	Suchá vína	62
8.3.2	Polosuchá vína	64
8.3.3	Polosladká vína	66
	ZÁVĚR	68
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	70
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	75
	SEZNAM OBRÁZKŮ	77
	SEZNAM TABULEK.....	78
	SEZNAM PŘÍLOH.....	79

ÚVOD

Víno, k jehož výrobě jsou surovinou hrozny vinné révy, je jedním z nejdéle známých alkoholických nápojů. Jeho doložená historie se vyvíjela od dávnověkých obyvatel Mezopotámie a starého Egypta přes antiku Řecka a Říma a středověk Evropy až k dnešním dnům. Pěstování vinné révy na našem území je podle archeologických nálezů známo necelé dva tisíce let. K rozšíření vinařství v široké míře došlo za vlády Karla IV.

Výroba vína se vyvinula v moderní průmyslové odvětví, nemalý podíl výroby však stále připadá i na malovýrobu. V naší zemi jsou využívány moderní technologie, je zde dobrá technologická základna a vinařství se prezentuje víny vysoké kvality. Pěstování vinné révy je podmíněno vhodnými klimatickými a geologickými podmínkami. K nejvýznačnějším vinařským zemím na světě patří Itálie, Francie, Španělsko a Portugalsko v Evropě, Argentina, Austrálie, Chile a USA v zámoří.

Víno vzniká díky alkoholovému kvašení a je složeno především z vody, sacharidů, kyselin, tříslovin, dusíkatých a minerálních látek, barviv, enzymů, vitaminů aj. Obsah těchto jednotlivých látek a jejich vzájemný soulad uděluje vínu jeho specifické vlastnosti, typickou chuť, barvu a vůni a dělá z něj jedinečný konzumní produkt.

Díky celosvětovému rozšíření vína jakožto jednoho z nejoblíbenějších nápojů je potřeba jej z hlediska kvality analyzovat a kontrolovat. Neustálé zvyšování nároků na kvalitu vína vyžaduje hlubší poznání technologických, chemických, biochemických a mikrobiologických procesů probíhajících během výroby, začínající sběrem hroznů, jejich zpracováním na víno, ošetřováním vína a končící expedicí lahvového vína, ale vyžaduje také potřebu provádět přesné, časté a časově nenáročné analýzy vhodné z hlediska ekonomické náročnosti a mnoha dalších faktorů.

Sacharidy jsou podstatným ukazatelem kvality vína. K jejich detekci se používá celá škála metod a postupů, kterými lze přesný obsah sacharidů ve víně zjistit. Své místo mají metody manuální, automatizované i instrumentální. V této práci jsou sacharidy analyzovány dvěma metodami stanovení, a to pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s refraktometrickou detekcí (HPLC - RID) a enzymatickým stanovením.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA RÉVY VINNÉ A VYBRANÝCH ODRŮD ČERVENÝCH A BÍLÝCH VÍN

Popisem odrůd révy vinné a jejich identifikací se zabývá ampelografie. Konkrétně se jedná o popis rostlinných orgánů a znaků révy vinné, jako jsou např. bobule, hrozny, listy aj.

1.1 Popis révy vinné

Fylogenetický vývoj révovitých rostlin probíhal v mesofytních stinných lesích Evropy, Asie a Ameriky. V lesních podmínkách rostou révovité rostliny jako liány, které se pnou po kmenech stromů, aby získaly dostatek světla pro svoji asimilační činnost. Během života v lesích se u těchto rostlin vyvinuly morfologické a fyziologické zvláštnosti, které jim umožnily v těchto podmínkách přežít. Mezi tyto morfologicko-fyziologické zvláštnosti révy vinné patří: růst orgánů rostlin probíhá především apikálně; orgány mají dorziventrální stavbu, tzn. vrchní i spodní strana se morfologicky odlišuje; réva vinná má slabě vyvinutá mechanická pletiva a proto vyžaduje k růstu opory; velké množství listů umožňuje intenzivní fotosyntetickou činnost; kořeny révy vinné mají schopnost hromadit velké množství zásobních látek [1].

Révový keř se rozděluje na části zdřevnatělé, které jsou dále rozděleny na orgány podzemní - kořeny (hlavní, vedlejší, povrchové) a orgány nadzemní (staré dřevo, dvouleté dřevo a letorosty) a na části nezdřevnatělé, mezi něž patří výhonky, listy, úponky, květenství, bobule a semena [1].

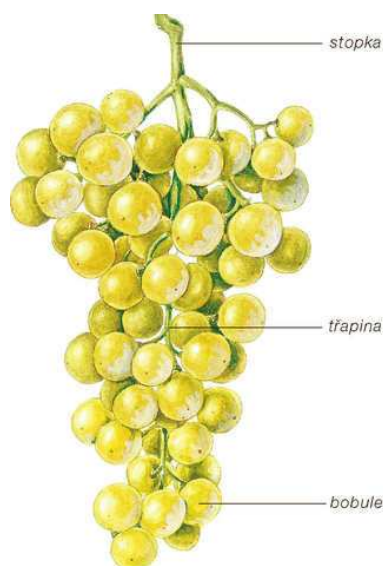
1.1.1 Hrozny révy vinné

Surovinou na výrobu vína jsou hrozny révy vinné (*Vitis vinifera*), což je liánovitá, světlo-milná rostlina, patřící do čeledi *Vitaceae* – révovité. Rod *Vitis* se rozděluje podle původu do tří ekologických skupin:

1. severoamerická skupina
2. východoasijská skupina
3. euroasijská skupina, která je představována pouze jediným druhem, *Vitis vinifera* L., který se vyskytuje ve dvou poddruzích: *Vitis vinifera* subsp. *sativa* D.C. (ušlech-

tilá réva vinná) a *Vitis vinifera subsp. silvestris* Gmel. (lesní réva), která je rozšířena v širokém areálu sahajícím od Španělska až po území Turkmenie. *Vitis vinifera* L. se dále rozděluje na tři sortotypy: *Vitis silvestris typica*, *Vitis silvestris aberans* a *Vitis silvestris balcanica*. *Vitis vinifera subsp. sativa* D.C. je nejvíce rozšířený druh. Kulturně se pěstuje už mnoho tisíciletí, v jejichž průběhu byl podrobován cílevědomému výběru, následkem čehož vzniklo velké množství odrůd [1, 2].

Morfologicky se hrozny révy vinné skládají z třapin se stopkami, které tvoří hlavní nosnou kostru hroznu a z bobulí různé velikosti, barvy a tvaru. Stopka a třapina s hlavními a vedlejšími osami tvoří z hmotnosti hroznu 3 - 5 % [3, 4].



Obr. 1 Morfologie hroznu [43]

1.1.1.1 Bobule

Bobule tvoří přes 95 % hmotnosti hroznu a jejím průřezem lze vidět, že sestává ze slupky, dužniny a semen (peciček). Slupka tvoří 6-12 % bobule, semena 2-5 % a dužnina 83-92 %. Bobule u révy vinné jsou velmi různorodé svým tvarem a velikostí. Tvar bobulí se může měnit podle ekologických podmínek a způsobu pěstování. Může být kulatý, kulovitý, vejčitý, zploštělý atd. Při výrobě většiny vín jsou třapiny se stopkami balastní součásti, které se musí odstranit, neboť obsahují chuťově nepříznivé polyfenoly a dřevité látky. Tenká vosková vrstva (kutikula) chrání bobuli před mechanickým poškozením a nadměrným vypařováním [3, 5, 6].

1.1.1.2 Slupka bobule

Na povrchu oplodí se vyvíjí slupka (epikarp), která se skládá z jedné vrstvy buněk epidermis a 10-15 hypodermálních buněk. Epidermis zabraňuje unikání vody z bobule a zároveň je odpovědná za mechanickou pevnost a ochranu. Vnější vrstva epidermis je pokryta nejen kutikulou, ale i silnou vrstvou voskovitého povlaku. Slupky mohou být tenkostěnné nebo tlustostěnné podle odrůdy, jejich hmotnost tvoří v průměru 8-10 % hmotnosti bobulí. Slupky obsahují cukry, organické kyseliny, třísloviny a barviva, důležitá zejména u modrých odrůd, z nichž se vyrábí červené víno [1, 4, 5].

Barviva a aromatické látky ze slupek ovlivňují odrůdový charakter, chuť i vůni budoucího vína. Bílé odrůdy mívají zelené, žlutozelené a jantarově zbarvené bobule. V buňkách slupky se u bílých odrůd nachází zelené barvivo - chlorofyl, které se v průběhu dozrávání bobulí mění na žlutá barviva - flavony. Červené odrůdy mají slupky červené až červenofialové. U modrých odrůd bývají slupky tmavočervené, modré až tmavomodré. Většina odrůd révy vinné má dále ve slupce koncentrované aromatické látky, třísloviny, kyseliny a dusíkaté látky. Obsahují většinové množství fenolických látek (třísloviny, barviva), minerálních látek (vápník, draslík), pektinů, proteinů a hroznových enzymů [5, 7].

1.1.1.3 Dužnina

Základní částí oplodí je dužnina (mesokarp). Dužnina se skládá z velkých buněk, které jsou v periferní části okrouhlé, nebo lehce protáhlé. Buňky mesokarpu mají tenké stěny a velké vakuoly, naplněné buněčnou šťávou, s vysokou koncentrací cukrů. V nich se nachází největší množství šťávy, kterou lze lehce získat. U většiny odrůd je bezbarvá, někdy načervenalá a jen u odrůd zvaných barvířky (např. Neronet, Inkoustník, Alibernet) a některé přímoplodící odrůdy obsahují červené barvivo i v dužnině. Dužnina bývá masitá, šťavnatá nebo sliznatá. Stav dužniny má vliv na způsob lisování a vylisnost moštu. Přibližně 8 % z celkové hmotnosti dužniny připadá na cévní svazky, zbytek na sladkou šťávu (mošt) [5, 6, 7].

1.1.1.4 Semena

Semena révy vinné náleží k typu anatropních semen. Ve zralém stavu má semeno většinou hruškovitý tvar. Semena jsou uložena uvnitř bobulí ve formě peciček s vysokým obsahem tříslovin. V bobuli bývají 1 až 4 semena. Některé stolní odrůdy pro sušení a výrobu rozi-

nek, jako korintské a Sultánky, jsou bezsemenné. Semena jednotlivých odrůd se liší barvou, tvarem a velikostí. Obsahují 10-20% olejů, které se skládají z triacylglyceridů, kyseliny stearové, palmitové a linolové. Dále obsahují značné množství tríslovin a hořkých látek. Proto je důležité, aby při lisování nebyly rozdrceny, jinak by se do moštu dostaly nežádoucí látky [1, 3, 5].

Po vylisování rmutu zůstávají v lisu jako odpad matoliny. Jejich množství je závislé na dokonalosti lisování a odrůdě. Matoliny se dají využít na výrobu druháku, po vykvašení na destilát, po zchutnění na krmivo pro dobytek nebo se mohou kompostovat. Ze semen se vyrábí jedlý olej a vinný tanin [5].

1.1.2 Zrání hroznů

Během zrání se zvyšuje obsah cukrů ve šťávě bobulí a zvyšuje se její hustota. Současně se snižuje obsah veškerých kyselin, kyselina jablečná je prodýchávána na cukr. Rozlišují se následující stadia vyžralosti:

- buketní zralost: úplné hroznové aroma, obsah cukru ještě není maximální
- plná zralost (fyziologická zralost): je dosaženo maximálního obsahu cukru, získatelného asimilací, hrozny obsahují veškeré živiny a barviva, pecičky jsou vyžralé, bobule jsou měkké
- přezralost: slupka bobule je prodyšná, voda se může odpařovat, ostatní složky se zahušťují, částečně odbourávají [3].

1.2 Vybrané odrůdy bílých vín

Odhaduje se, že na světě se pěstuje více jak dvacet tisíc odrůd révy vinné. Jsou to odrůdy velkozrnné, pěstované jako stolní a určené pro přímý konzum, a odrůdy drobnozrnné, které se používají hlavně k výrobě hroznových moštů a hroznového vína. Hrozny těchto odrůd jsou husté, bobule malé, s velkým množstvím semen, proto jsou pro přímý konzum méně vhodné. Rozdělují se obvykle na odrůdy určené pro výrobu bílých vín, k nimž patří odrůdy se zelenými, žlutými, růžovými nebo červenými hrozny a na odrůdy určené pro výrobu vín červených [7, 8, 9, 10, 11].

V této kapitole jsou popsány jen odrůdy bílých vín, které byly vybrány pro analýzu: Müller Thurgau, Chardonnay, Ryzlink rýnský, Sauvignon, Tramín červený, Muškát moravský,

Rulandské bílé, Aurelius, Děvín. V následující části je popsán původ, velikost výsadby na území ČR, koeficienty plodnosti, průměrná cukernatost, obsah kyselin a typické vlastnosti vín, které jsou z těchto odrůd vyráběny.

Müller Thurgau

Odrůda Müller Thurgau vznikla ve výzkumném a šlechtitelském ústavu v Geisenheimu roku 1882, jako kříženec mezi odrůdami Ryzlink rýnský a Sylvánské zelené. Křížení provedl prof. dr. Müller, který pocházel ze švýcarského kantonu Thurgau. Výsadba této odrůdy zaujímá 14 % z celkové plochy vinic v ČR. Koeficient plodnosti odrůdy je 1,3. Cukernatost se pohybuje v rozsahu 15 - 19 °NM, v lepších ročnících i přes 21 °NM. Obsah kyselin je nižší, pohybuje se v rozmezí od 8 do 10 g.l⁻¹ [1, 4, 12].

Příjemné výrazné, muškátově broskvové aróma odrůdy Mülleru Thurgau vyniká hlavně na Znojemsku a Uherskohradištsku. Za optimálních podmínek je víno světlé barvy se zelenožlutým odstínem. Ve vůni vína vynikají tóny muškátu spolu s dalšími ovocnými odstíny v závislosti na velikosti sklizně, na počasí daného ročníku a na reduktivnosti školení vína [10, 13].

Chardonnay

Odrůda Chardonnay pochází z Burgundska a vznikla samovolným křížením odrůd Pinot noir a Heunisch, jak bylo zjištěno genovou analýzou. U nás se od nepaměti pěstovala ve smíšených výsadbách s Rulandským bílým. Sklizně jsou poněkud nižší než u Rulandského bílého, ale jakost vína je vyšší. Výsadba Chardonnay zaujímá 2,3 % plochy vinic v ČR. Množství a kvalita sklizně jsou závislé na biologické hodnotě výsadbového materiálu. V našich vinohradnických oblastech dosahuje cukernatost 19 - 21 °NM, při obsahu kyselin 11 - 12 g.l⁻¹ [1, 10, 12, 13].

Při usměrnění sklizně voní Chardonnay po zelených jablkách a při stárnutí přicházejí vůně akátů a hrušek, citronů a grapefruitů, medu a nakonec lískových oříšků. Pro kvalitu vín odrůdy Chardonnay je důležité, aby se vždy zpracovávaly hrozny dobře vyzrálé na suché víno s vyšším obsahem alkoholu. Zbytkový cukr víno nepříjemně rozšiřuje. Oproti Rulandskému bílému je plnější, harmoničtější a má vyšší intenzitu aromatických látek. Víno je vhodné pro dlouhodobé uchovávání a jako jedno z mála bílých odrůdových vín je vhodné pro technologii "barrique" [1, 4].

Ryzlink rýnský

Ryzlink rýnský pochází původně z Německa a Alsaska. Nyní se tato odrůda pěstuje po celém světě. Ryzlink rýnský zaujímá 6 % z celkové plochy vinic v ČR. Vyžaduje výborné jižní polohy, nejlépe svažité. V chuti Ryzlinku rýnského hraje velkou úlohu kyselina a její zralost. Je to odrůda s poměrně pravidelnou plodností. V našich pěstitelských podmínkách dosahuje cukernatost 17 - 19 °NM, při obsahu kyselin 11 - 13 g.l⁻¹. V dobrých ročnicích dosahuje cukernatost přes 21 °NM [1, 12].

Odrůdová vína dosahují vysoké kvality. Jsou vysoce jakostní, aromatická s harmonií kyselin a typickým odrůdovým charakterem. Hrozny je vhodné sklízet v plné zralosti, protože potom vína získávají více aromatických látek [10, 13].

Sauvignon

Sauvignon pochází z největší francouzské vinařské oblasti Bordeaux. Hrozen je malý a bobule obsahují aromatické látky, které zpočátku tvorby mají tóny vůni kopřivových nebo po černém rybízu či angreštu a při pozdějším zrání pak přecházejí do vůně zralých broskví. V ČR se Sauvignon pěstuje na Moravě ve větším měřítku až od druhé poloviny 20. století a výborné jakosti dosahují vína na Znojemsku. Výsadba této odrůdy zaujímá 3 % z celkové plochy vinic v ČR. Zelenožluté bobule s tlustší slupkou mají výrazně aromatickou dužinu. Plodnost odrůdy Sauvignon je střední a méně pravidelná. V našich podmínkách dosahuje Sauvignon cukernatost 17 - 19 °NM, při obsahu kyselin 10 - 12 g.l⁻¹.

Vůně a chuťová charakteristika Sauvignonu závisejí na tom, kde byly hrozny pěstovány. Víno je vždy svěží, silně aromatické [1, 10, 12, 13].

Tramín červený

Tramín červený pochází z Alsaska. Vína z této odrůdy mohou být suchá nebo sladká. Assimilace sytě zelených listů je intenzivní a cukernatost malých, široce kónických hroznů je vysoká. Výsadba Tramínu červeného zaujímá 2 % z celkové plochy vinic v ČR. Sklizně poskytuje tato odrůda poměrně nízké. Cukernatost se pohybuje okolo 20 °NM a obsah kyselin dosahuje 8 g.l⁻¹.

Tramín červený dává plná a kořenitá vína. Jsou-li dobře vyzrálé hrozny, pak je ve víně kromě kořenitosti, velmi jemné aroma připomínající vůni růží. Vína Tramínu mají intenzivnější barvu než většina ostatních bílých vín - jsou zelenožlutá až zlatožlutá. Většina vín

Tramínu bývá se zbytkovým cukrem, který podporuje tropické aroma a chuť [1, 10, 12, 13].

Muškát moravský

Odrůda Muškát moravský je rozšířena pouze v českých a moravských vinohradnických oblastech. Na Moravě je pěstován asi na 130 ha s tendencí k dalšímu rozšiřování. Odrůda byla vyšlechtěna na Šlechtitelské stanici v Polešovicích. Je to kříženec odrůd Muškát Ottonel a Prachttraube. Výnosy sklizně jsou vysoké. Muškát moravský je vhodné sklízet při nižší cukernatosti pro zachování dostatečného obsahu kyselin. Obsah kyselin se pohybuje mezi 7 - 8 g.l⁻¹ [10, 12, 14].

Je to odrůda vhodná jako ranný stolní hrozen i na lehká aromatická vína s nižším obsahem kyselin. Poskytuje chuťově jemná, aromatická, odrůdová vína s muškátovým charakterem. Aroma Muškátu moravského je o něco jemnější ve srovnání s Muškátem Ottonelem. Rovněž kyseliny jsou mírně sníženy. Hrozny této odrůdy se používají i k výrobě nealkoholických nápojů a jako aromatická přísada do šumivých vín [1, 4, 10, 12, 14].

Rulandské bílé

Rulandské bílé se u nás pěstuje od nepaměti. Výsadba Rulandského bílého pokrývá 5 % z celkové plochy vinic v ČR. Název Rulandské je anachronismus, který vznikl nepochopením a neznalostí ampelografických realit v roce 1993, kdy bylo Burgundské bílé přejmenováno na Rulandské bílé. Ve skutečnosti se jedná o francouzskou odrůdu Pinot blanc. V našich podmínkách dosahuje cukernatosti 18 - 23 °NM, při obsahu kyselin 10 - 13 g.l⁻¹. Sklizeň bývají středně vysoké. Rulandské bílé asimiluje intenzivně a má schopnost zvýšit koncem října cukernatost tak, aby se mohly vyrábět pozdní sběry a výběry [1, 4, 14].

Víno je extraktivní s harmonickými kyselinami a jemným aromatem. Vysokou jakost mohou dosáhnout pozdní sběry, při lahvé zralosti. Při odpovídajících podmínkách jsou vína harmonická, plná a bohatá extraktivními látkami [1, 10, 13].

Aurelius

Jedná se o odrůdu československého původu, která byla vyšlechtěna na šlechtitelských stanicích ve Velkých Pavlovicích a Perné. Vznikla křížením odrůd Neuburské a Ryzlink rýnský. Odrůda je velmi plodná a hrozny mívají poměrně vysokou cukernatost. Kvalitní plné víno má charakter vín Ryzlinku rýnského s intenzivními aromatickými látkami širšího

spektra, což vytváří určitou kořenitost. Výsadba zaujímá 0,3 % plochy vinic v ČR. Vyznačuje se dobrými výnosy, přírodním zbytkovým cukrem a vysokou kvalitou. Průměrné sklizně dosahují $10 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$, cukernatost 17 - 23 °NM a obsah kyselin 8 - 12 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [1, 4, 13, 14].

Děvín

Odrůda Děvín byla vyšlechtěna v KVÚVV Bratislava. Její dosavadní plocha výsadby v ČR je velmi malá. Vznikla křížením odrůd Tramín červený a Veltlínské červenobílé. V současné době se rozšiřuje ve slovenských vinohradnických oblastech a postupně se začíná rozšiřovat i na Moravě. Tato odrůda dosahuje pravidelné a vysoké sklizně v rozmezí 13 - 17 $\text{t}\cdot\text{ha}^{-1}$. Může dosahovat cukernatosti až 24 °NM. Obsah kyselin se pohybuje v rozmezí 7 - 9,5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [1, 13, 14].

Víno je extraktivní, plné, aromatické. Buket Děvínu se pohybuje mezi muškátovým a tramínovým aromatem [4].

1.3 Vybrané odrůdy červených vín

K tradičním odrůdám k výrobě červeného vína náleží ty, které se v různých oblastech dlouhodobě pěstují a našly své místo na trhu: Cabernet Sauvignon, Modrý Portugal, Rulandské modré, Frankovka, Cabernet Moravia, Zweigeltrebe, Svatovavřínecké. V podmínkách ČR patří mezi tradiční modré odrůdy Rulandské modré, Frankovka, Zweigeltrebe, Svatovavřínecké, Modrý Portugal, André [11, 59].

Cabernet Sauvignon

Pochází z francouzské vinařské oblasti Bordeaux, kde se pěstuje spolu s dalšími odrůdami Cabernet franc a Merlot k výrobě červených vín. Výsadba zaujímá méně než 0,1% z celkové plochy vinic v ČR. Výnosy se pohybují kolem 6 - 9 $\text{t}\cdot\text{ha}^{-1}$, při cukernatosti 18 - 20°NM a obsahu kyselin 9 - 10 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Z Cabernet Sauvignonu se získává víno bohaté na taniny s bohatou chutí a zřetelnými aromaty. Vůně a chuť připomínají černý rybíz, fialky a tabák. Víno zraje velmi pomalu a teprve při jeho zrání v sudech barrique a po dlouhodobém uložení v lahvích se objevují nejvýznamnější tóny zralosti a plnosti červeného vína [1, 10, 12, 13].

Modrý Portugal

Pro široké upotřebení v kategorii stolních i jakostních vín se u nás pěstovalo dříve nejvíce Portugalské modré, které se k nám rozšířilo z Rakouska. Modrý Portugal zaujímá 2,7 % z celkové plochy vinic v ČR. Má poměrně pravidelné a vysoké sklizně. V našich podmínkách dosahuje cukernatost 17 - 19 °NM při obsahu kyselin 8 - 9 g.l⁻¹. Použitím zvláštní technologie - tzv. karbonické macerace, lze vytvořit příjemný typ mladého červeného vína z Modrého Portugalu, které přichází na trh pod názvem Martinské víno v den svátku sv. Martina, tedy ještě před Beaujolais [1, 10, 13].

Rulandské modré

Rulandské modré je tradiční odrůdou jak v Čechách, tak na Moravě. Původ odrůdy je ve dvou francouzských vinařských oblastech - Burgundsku a Champagne. Plocha výsadby zaujímá 1,6 % z celkové plochy vinic v ČR. Plodnost této odrůdy je střední. Při vyšší úrodě, nad 7 t.ha⁻¹, klesá kvalita vína. V našich pěstitelských podmínkách dosahuje cukernatost 18 - 20 °NM, při obsahu kyselin 10 - 12 g.l⁻¹. Odrůdový buket je kořenitý, hořkomandlový. Pro víno této odrůdy je typická světle granátová barva [1, 10, 12, 13].

Frankovka

Jedná se o starou německou odrůdu, která má původ v oblasti Franken. Tato odrůda zaujímá 5 - 8 % z celkové plochy vinic v ČR. Frankovka dosahuje cukernatosti 17 - 20 °NM, při obsahu kyselin 9 - 11 g.l⁻¹. Víno je tvrdší, s čerstvou kyselinou, charakteristickou vůní. Barva je jemně červená, nepřliš sytých tónů. Víno má výraznější třísloviny [4, 14].

Zweigeltrebe

Odrůda Zweigeltrebe pochází z Rakouska, kde byla vyšlechtěna v Klosterneuburgu křížením odrůd Svatovavřínecké a Frankovka modrá. Zaujímá 33 % z celkové plochy vinic v ČR. Zweigeltrebe je velmi plodná odrůda s pravidelnými sklizněmi. Průměrné sklizně se pohybují kolem 10 t.ha⁻¹, při cukernatosti 17 - 19 °NM a obsahu kyselin 8 - 9 g.l⁻¹. Víno je bohaté na barviva a třísloviny. Svým charakterem je podobné Svatovavříneckému. Vína jsou tmavě granátové barvy s fialovým zábleskem a mají aroma ovocně-kořenité mnohdy připomínající bobulové ovoce [1, 10, 13].

2 POPIS CHEMICKÉHO SLOŽENÍ VÍNA

Víno obsahuje látky, jež jsou původní součástí moštů nebo rmutů, látky vznikající při kvašení a látky cizorodé, které se dostávají do vína v průběhu technologického procesu. K původním složkám moštů se řadí především voda, cukry, kyseliny, třísloviny, dusíkaté látky, minerální látky, barviva, enzymy, vitaminy a látky tvořící chuťové a aromatické složky vína [10].

Voda, sacharidy a organické kyseliny jsou nejdůležitějšími chemickými složkami bobulí hroznů a následně získaného moštu. Révové víno je kapalina složená z těkavých a netěkavých látek. K těkavým látkám patří voda, alkoholy, těkavé kyseliny a buketní látky. Celkový extrakt vína patří k netěkavým látkám, mezi něž patří cukry a ostatní necukerné složky - kyseliny, třísloviny, bílkoviny, pektiny, tuky, enzymy, vitaminy, barviva a minerální látky [7, 16, 17].

2.1 Voda

Voda je důležitý faktor růstu hroznů. Nejdůležitější vliv na její obsah ve víně má klima a půda. Ideální pro pěstování vinných odrůd jsou půdy s relativně tenkou orniční vrstvou, lehce prostupným a dobře odvodněným podložím s dobrou schopností zadržovat vodu. Voda jako hlavní složka hroznů a samotného vína hraje rozhodující roli u základních charakteristik vína. Uděluje vínu tekoucí charakter a je esenciální složkou pro mnoho chemických reakcí zapojených do růstu hroznů, fermentace šťávy a zrání vína. V případě nedostatku vody je nezbytné zavlažovat nebo přijmout efekty vodního stresu. Vodní stres je stav, v němž se rostlina nachází pod vlivem nepříznivých faktorů. Tento stres ovlivňuje různou měrou rostlinné procesy jako růst, fotosyntézu a transpiraci, přičemž růst listů a stonků je na vodní stres mnohem citlivější. Voda je také velmi významná jako rozpouštědlo jiných látek. V jednom litru moštu je obsaženo průměrně 780-850 g.l⁻¹ vody. Při přezrávání se obsah vody může snižovat v důsledku výparu, působením ušlechtilé plísně *Botrytis cinerea* a mrazu [7, 15, 18, 19, 20].

2.2 Sacharidy

Sacharidy se dělí dle počtu cukerných jednotek vázaných v molekule na monosacharidy, které obsahují jen jednu cukernou jednotku, na oligosacharidy, které jsou složeny ze dvou až deseti cukerných jednotek a polysacharidy, které jsou složeny z více než deseti cukerných jednotek. Sacharidy vznikají v přírodě v buňkách fotoautotrofních organismů asimilací vzdušného oxidu uhličitého v přítomnosti vody a za využití energie denního světla (fotosyntézou) přeměněné ve fotosystémech na chemickou energii. Sacharidy jsou tedy stálou složkou všech buněk. Sacharidy mají v buňkách různé funkce. Využívají se především jako zdroj energie (1 g cukru poskytuje 17 kJ, tj. 4 kcal) a proto se spolu s bílkovinami a lipidy řadí k hlavním živinám. Jsou také základními stavebními jednotkami mnoha buněk, chrání buňky před působením různých vnějších vlivů. Jsou biologicky aktivními látkami nebo složkami mnoha biologicky aktivních látek, jako jsou glykoproteiny, některé koenzymy, hormony, vitaminy aj. Významné jsou i jejich organoleptické vlastnosti (chuť, vzhled, vůně) [21, 22, 23, 24, 25, 27, 60].

Dle Berthelse [63] je na začátku období růstu v hroznech obvykle přítomno více glukózy než fruktózy (přibližně 5krát více), ale silný vývoj fruktózy je příčinou toho, že v období sklizně jsou jejich koncentrace přibližně vyrovnané. Během procesu fermentace jsou to právě sacharidy, jež jsou kvasinkami transformovány na etanol. Během zrání je sacharóza hydrolyzována pomocí enzymu invertáza na glukózu a fruktózu. Fruktóza se stává zdrojem pro kvasinky v průběhu alkoholového kvašení teprve po vyčerpání glukózy, hlavního substrátu. Proto je také ve zbytkovém cukru vyšší obsah fruktózy, neboť kvasí hůře, s výjimkou odrůdy Chardonnay, kde je dle Jacksona [19] více glukózy. Dle Malíka [64] je rozložení hexózy do jednotlivých částí hroznů následující: třapina a slupka a semena pouze stopově, dužnina 10 - 30%. Dle Velíška [25] obsahují zralé hrozny glukózu a fruktózu zhruba ve stejném množství (glukóza 8,0 %, fruktóza 8,2 %), v přezrálých hroznech převládá fruktóza. Dle Pavlouška [43] je ve vinných moštích obsah cukrů 120-250 g.l⁻¹. Obsah zbytkových cukrů je v suchých vínech obvykle nižší než 1,5 g.l⁻¹. Při vyšších koncentracích mohou způsobit mikrobiální riziko. Zbytkové cukry, které zůstávají ve víně po alkoholické fermentaci, jsou zdrojem energie pro kvasinky a bakterie [3, 19, 25, 27, 28, 29, 30].

2.2.1 Fyzikální a chemické vlastnosti monosacharidů

Roztoky monosacharidů zpravidla vykazují určitou optickou otáčivost. Tyto roztoky otáčejí rovinu polarizovaného světla buď doprava nebo doleva. Anomery vykazují rozdílné optické otáčivosti. Ke stanovení sacharidů se využívá právě těchto některých fyzikálních vlastností - optická otáčivost, index lomu, případně některých biologických vlastností - zkvasitelnost, enzymatické změny [27, 31].

2.2.2 Glukóza

D-glukóza je nejvýznamnější monosacharid. Řadí se mezi aldózy. Je rozpustná ve vodě, zředěném i koncentrovaném etanolu, metanolu, pyridinu, acetonu a kyselině octové. Bod tání se pohybuje v rozmezí od 141 do 150 °C. Hustota, viskozita a refrakce roztoků glukózy je blízká hodnotám sacharózy. Je to hexóza, která ve vodných roztocích otáčí rovinu polarizovaného světla doprava, proto se také nazývá dextróza. Jsou známy dva anomery: L-glukóza a D-glukóza lišící se pouze tím, že jejich vodný roztok stáčí rovinu polarizovaného světla opačným směrem. Pro své redukční vlastnosti (redukuje Fehlingův roztok) je nazývána redukujícím cukrem. D-glukóza je také známá pod jménem hroznový cukr [21, 29].

Tento redukující sacharid, v čistém stavu bílá krystalická látka se sladkou chutí, je nejdůležitější a ve formě polymerů nejrozšířenější cukr v přírodě. Ve vodném roztoku po ustavení rovnováhy je 36 % α -pyranózy a 64 % β -pyranózy, oba anomery jsou v židličkové konfiguraci. Nachází se ve zralém ovoci - nejvíce ve vinných hroznech, spolu s D-fruktózou v medu a v množství kolem 0,1 % je obsažena v krvi. Vázanou ji obsahují téměř všechny složité sacharidy. Je stavební jednotkou maltózy, laktózy a sacharózy a je monomerem mnoha polysacharidů např. škrobu, celulosy, β -glukanů a glykogenu. Je snadno stravitelná, používá se v lékařství jako umělá výživa. [6, 29, 32].

Zahřátím nad 160 °C se D-glukóza mění na tmavohnědý karamel, který se používá v potravinářském průmyslu k barvení lihovin a octu. Alkoholovým (etanolovým) kvašením D-glukózy účinkem kvasinek za nepřístupu vzduchu vzniká etanol a oxid uhličitý. Při mléčném kvašení (při silážování a kysání zelí) vzniká kyselina mléčná. Technicky se D-glukóza vyrábí hydrolýzou škrobu. Používá se k výrobě etanolu, glycerolu, acetonu, kyseliny citrónové, kyseliny L-askorbové aj. [21, 33, 34].

2.2.3 Fruktóza

D-fruktóza (ovocný cukr) je nejdůležitějším představitelem ketóz, který se bohatě vyskytuje v přírodě, téměř výhradně v konfiguraci D. Její roztoky otáčejí rovinu polarizovaného světla doleva, proto je nazývána také levulosa. Tento monosacharid, tvořící bílé krystaly se silně sladkou chutí byl objeven jako štěpný produkt sacharózy. Stejně jako glukóza je redukujícím cukrem. Jako volná je obsažena v ovoci a v medu. D-fruktóza je stavební jednotkou mnoho oligo- a polysacharidů, jako např. oligofruktosidy, inulin, levan. Vázaná s D-glukózou tvoří disacharid sacharózu [21, 29, 32, 33, 34].

Směs D-glukózy a D-fruktózy v poměru 65:35 je takzvaný fruktózový sirup. D-fruktóza je sladší než D-glukóza a sacharóza a nesnadno krystalizuje. Pro tyto vlastnosti je jí dávana přednost před sacharózou především pro slazení nápojů a ovocných sirupů. Je dobře rozpustná ve vodě a v omezených dávkách je přijatelná pro diabetiky [21, 29, 32, 33, 34].

2.2.4 Sacharóza

Tento disacharid je složen z molekuly glukózy a fruktózy. Může být v malém množství (průměrně 4 g.l⁻¹) obsažen v bobulích révy vinné. Dle Velíška [25] je obsah sacharózy v odrůdách révy vinné nepatrný, ale v některých odrůdách révy liščí, původem ze Severní Ameriky a v jejích hybridech může tvořit až 25 % celkového obsahu cukrů. Invertáza štěpí sacharózu na glukózu a fruktózu a tím umožňuje kvašení. Tato reakce se nazývá inverzí, protože optická otáčivost roviny polarizovaného světla sacharózy se mění z pozitivní výchyly na negativní. Smysl otáčení se tedy mění opačně - inverzně. Glykosidázy jsou částečně vázány na cukr, což je sice činí stabilními, ale i senzoricky neúčinnými. Teprve rozštěpením glykosidické vazby, ke kterému může dojít pomocí enzymů nebo kyselin, se uvolní aromatické látky důležité pro mošt a víno [3, 10, 16, 22, 32].

2.2.5 Další sacharidy

Kromě glukózy a fruktózy (jejich poměr bývá 0,5-0,9) obsahují vína v relativně větším množství také arabinózu, xylózu, galaktózu, které se nacházejí i po fermentaci a malá množství dalších monosacharidů a oligosacharidů (Tab. 1), které jsou nezkvasitelné a jejich obsah ovlivňuje hodnoty při analytickém stanovování cukru.

Dle Minárika [15] je obsah pentóz a pentozanů v moštu až $1,57 \text{ g.l}^{-1}$. Dle Malíka [64] je nejvíce pentóz a pentozanů obsaženo v semenech (3,9 - 4,5 %), dále v třapině (1 - 2,8 %), slupce (1-1,2 %) a dužnině (0,2 - 0,5 %). Obsah cukrů určuje tzv. cukernatost hroznů, která je základním parametrem pro zařazení vín do jakostních stupňů. Polysacharidy (škrob z třapin) jsou jako podstatná část koloidních sloučenin ve víně nežádoucí, mohou způsobovat potíže při filtraci [11, 25, 35].

Obsah alditolů ve vínech bývá vyšší nebo stejný jako v mošttech. Vyšší množství manitolů ve vínech ($1 - 30 \text{ g.l}^{-1}$) může podle Velíška způsobit napadení hroznů plísní *Botrytis cinerea* nebo bakteriemi *Bacterium manniopoeum* způsobujícím manitolové kvašení.

Tab. 1 Obsah sacharidů ve vínech [25]

Sacharid monosacharidy	Obsah v mg.l^{-1}	Sacharid oligosacharidy	Obsah v mg.l^{-1}
ribóza	6,3-62,0	trehalóza	0-61,0
arabinóza	1,0-242,0	cellobióza	2,7
xylóza	0,6-146,0	maltóza	1,5
glukóza	56,0-25000,0	sacharóza	0,0
mannóza	2,37	laktóza	1,5
galaktóza	6,3-249,0	melibióza	stopy-1,0
fruktóza	93,0-26500,0	rafinóza	0-1
rhamnóza	2,2-121,0		

2.3 Kyseliny

Stejně jako cukry vznikají i kyseliny asimilací listů z vody a oxidu uhličitého. Celkové množství kyselin závisí na odrůdě, viniční trati, zralosti hroznů a ročníků. Během vyzrání vzniká nejdříve kyselina jablečná a později kyselina vinná. Mezi těkavé kyseliny patří kyselina mravenčí, octová, propiónová a jiné. Mezi stálé kyseliny patří hlavně kyselina vinná a jablečná, které se ve víně nejvíce vyskytují [3, 7, 10].

Kyselost vína se vyjadřuje jako obsah titrovatelných kyselin, přepočítaných na kyselinu vinnou. Různé jiné kyseliny a složky ztěžují jejich stanovení v moštu, proto může být obsah kyseliny vinné a jablečné ve skutečnosti o 1 až 2,5 % vyšší než udává výsledek stanovení titrovatelných kyselin. Kyselina vinná je přítomná i ve formě hydrogenvinanu draselného - vinného kamene. Velmi vysoký obsah kyseliny vinné (přes 12 g.l^{-1}) může být snížen

odkyselováním, při kterém kyselina vinná vypadne pomocí uhličitanu vápenatého. Tím zůstane ve víně více draslíku, který je jejím reakčním partnerem. To přináší na jednu stranu zakulacení a plnost vína, na druhou stranu větší nebezpečí pro biologické odbourávání kyselin [3, 7, 10].

Ostatní stálé kyseliny jsou obvykle odvozeny od metabolismu kvasinek. Patří mezi ně kyselina citrónová, isocitrónová, fumarová a α -ketoglutamová a v nepatrných množstvích kyselina askorbová, glukonová, jantarová, šťavelová a další [36].

2.4 Dusíkaté látky

Dusíkaté sloučeniny v hroznech nebo ve víně obsahují anorganické formy jako amoniak nebo dusičnany a organické formy jako jsou aminy, amidy, aminokyseliny, pyraziny, dusíkaté báze, pirimidiny, proteiny a nukleové kyseliny. Komplexní organické sloučeniny jako jsou proteiny, pirimidiny a nukleové kyseliny jsou nezbytné pro růst a metabolismus hroznů a buněk kvasinek, ale nemají významný sensorický vliv na víno, nicméně mohou způsobovat ve víně problémy. Bílkoviny výrazně ovlivňují stabilitu moštu a vína. Aminokyseliny jsou zastoupeny z větší části prolinem, threoninem a kyselinou glutamovou, jsou výživou pro kvasinky a bakterie. Podílejí se také na tvorbě a vývoji aromatických látek při tvorbě lahvové zralosti vína. Celkový obsah se ve víně pohybuje mezi 250 až 4 500 mg.l⁻¹, značně se liší, je ovlivněn odrůdou i ročníkem, v suchých letech je bílkovin více [3, 7, 10, 19, 32].

2.5 Alkoholy

Vína mají ve srovnání s jinými nápoji připravenými kvašením relativně vysoký obsah etanolu. Po vodě je etanol s průměrnými 9 až 14 % obj. hlavní složkou vína. Má významný vliv na charakter chuti. Jeho obsah souvisí s obsahem cukrů v moštu, tedy se stupněm zralosti hroznů a se stupněm prokvašení. Je korekčním faktorem kyselé chuti. U červených vín bohatých na třísloviny (produkty kondenzace 2-10 molekul katechinů aj. flavonoidů) etanol koriguje jejich hořkou a svíravou chuť. Vyšší obsah alkoholu zajišťuje vyšší stabilitu vína proti kvasničným zákalům i různým bakteriálním onemocněním. Jeho obsah je jedním z hlavních ukazatelů při posuzování jakosti a při kontrole vína [25, 34].

Víno obsahuje v malých množstvích také metanol, který vzniká odbouráváním pektinu a zvyšuje se jen intenzivním nakvácením rmutu (u červených vín). Běžný obsah metanolu se u bílého vína pohybuje mezi 17 - 100 mg.l⁻¹ a u červeného vína mezi 60 - 230 mg.l⁻¹. Není hlavní složkou, ale je důležitý pro vývoj vůně ve víně. Jeho oxidací vzniká formaldehyd a kyselina mravenčí. Limitní množství metanolu vzniká při enzymatickém odbourávání pektinů, přičemž methylové skupiny pektinů jsou uvolňovány jako metanol. Množství metanolu ve fermentovaných nápojích je vlastně poukázání na množství pektinů. Jeho obsah může zvýšit přidavek pektolytických enzymů přidávaných při číření vína [19, 28].

Další složkou jsou vyšší alkoholy, tzv. přiboudlina, které jsou ve víně zastoupeny jen v relativně malém množství, přesto mají na základě výrazného vlivu na vůni a chuť důležitou roli pro aroma vína. Vyšší alkoholy opětovně vznikají z produktů vzniklých odbouráváním cukrů během kvašení. Patří proto mezi tzv. sekundární produkty kvašení a jsou důsledkem množení kvasinek. Mezi kvantitativně nejdůležitější vyšší alkoholy patří 1-propanol, 2-methyl-1-propanol, 2-methyl-1-butanol a 3-methyl-1-butanol. Z dalších látek má významný vliv také glycerol, který vzniká jako produkt primárního kvašení a dodává vínu plnost [3, 6, 19].

2.6 Třísloviny

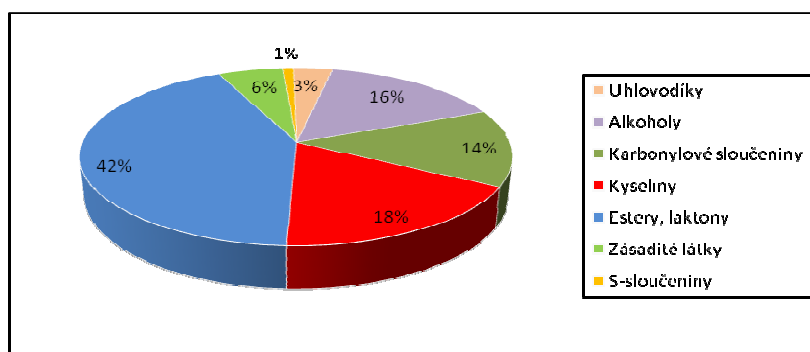
Třísloviny, jsou různorodá skupina chemických látek obsažených ve víně, které mají vliv na barvu, stárnutí a texturu vína. Ve větším množství dávají trpkou, až svíravou nebo drsnou chuť. Jsou mezi nimi látky baktericidní a některé z nich mají příznivý vliv na lidské zdraví. Jsou obsaženy hlavně v třapínách a ve slupkách bobulí nebo mohou být do vína uvolňovány skladováním v dubových sudech nebo přidávkem tříslovitého prachu nebo drti. Obsah tříslovin v bílém víně se pohybuje pod 200 mg.l⁻¹. U červeného vína je jejich obsah třikrát až desetkrát vyšší. Naležení rmutu a silnější lisování podporuje zvyšování obsahu těchto látek. Oenotantin tvoří s bílkovinami ve víně sraženiny a přispívá tak k samočištění vína. Mezi nejvýznamnější z patří flavonoidy, flavonoly - katechin, epikatechin, taniny, stilbeny aj. [3, 7, 19, 34, 36].

2.7 Aromatické látky

Organoleptické vlastnosti a kvalitu vín ovlivňuje mnoho různých faktorů. Kvalita vůně a chuti závisí na vyváženosti dílčích vůní a chutí. Jednotlivá vína se vzájemně liší v závis-

losti na odrůdě révy, zralosti hroznů, eventuálním napadení mikroorganismy (zvláště plísní *Botrytis cinerea*), podmínkách během kvašení moštu (dominantním druhem mikroorganismů jsou kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, proto při fermentaci hraje důležitou roli pH a teplota) a dalších faktorech. Jednotlivé odrůdy révy vinné se vyznačují charakteristickým buketem a aromatem. K vonným látkám patří lehce těkavé složky jako alkoholy a estery, zatímco k chuťovým látkám špatně těkavé nebo netěkavé sloučeniny (organické kyseliny, cukr, polyfenoly) [3, 25, 33, 34].

Odhaduje se, že vína obsahují 400 - 600 sloučenin v celkovém množství 0,8 - 1,2 g.l⁻¹. Aroma je ve vinařské terminologii označením pro vůni mladých vín, transformací aroma během stárnutí chemickými reakcemi vzniká buket [25].



Obr. 2 Poměr jednotlivých AL ve víně [25]

Podle odrůdy mají vinné hrozny neutrální (např. Müller Thurgau) nebo výrazné aroma (Muškát, Sauvignon). Primární aroma muškátových hroznů určuje především přítomnost osmi až deseti terpenových alkoholů, zejména linaloolu, geraniolu, nerolu, α -terpineolu a linalooloxidů. Jejich koncentrace bývá 0,1 - 0,3 g.l⁻¹ [25, 34].

Sekundární aroma představují především vyšší alkoholy a estery. Vyšší alkoholy jsou přítomny v poněkud větším množství než odpovídá jejich prahovým koncentracím, v nízkých koncentracích zaokrouhlují výsledné aroma, při koncentracích vyšších než zhruba 400 mg.l⁻¹ mají na aroma negativní vliv. Důležitou roli hraje ethyl-acetát. Při podprahových koncentracích 50-80 mg.l⁻¹ je spolu s dalšími látkami součástí žádoucího aroma, při koncentracích vyšších než 160 mg.l⁻¹ se projevuje drsnou chutí a vůní. Pro aroma zvláště bí-

lých vín jsou významné také ethylestery mastných kyselin vyskytující se v poměrně nízkých koncentracích, které však asi desetkrát převyšují prahové koncentrace [25].

2.8 Minerální prvky

Jak hrozny, tak víno obsahují minerální prvky (Tab. 2), přičemž jejich obsah se značně liší u bílých či modrých hroznů, stejně tak jako u bílého či červeného vína. Složení minerálních prvků v hroznech je ovlivněno půdou, zařízeními používanými během výrobního procesu a úpravami vína jako je čištění nebo filtrace. Minerální látky působí na organoleptické vlastnosti vína, tzn. vůni, chuťovou svěžest, barvu a celkový chuťový dojem.

Vápník, draslík, hořčík a sodík mají význam na buněčný metabolismus a úspěšné kvašení moštu. Měď, železo a mangan odpovídají za změny ve stabilitě vína a senzorické změny vína po lahvování. Železo a měď mohou způsobit kovově trpkou chuť vína. To se ovšem projeví pouze při vyšších než obvyklých koncentracích těchto látek. Nezbytným prvkem pro správný růst hroznů je síra a její sloučeniny [19, 25, 32, 36].

2.9 Vitaminy

Čerstvé hrozny obsahují značné množství vitaminů, jejich obsah (Tab. 2) se však snižuje lisováním, kdy jejich část zůstává ve slupkách a hroznových výliscích. Vitaminy se zúčastňují fyzikálně-chemických a biochemických procesech při přeměně moštů a vín, a proto se jejich obsah při těchto procesech snižuje. Proto mají vitaminy z hlediska výživy význam zejména při konzumaci čerstvých hroznů.

Víno obsahuje vitaminy skupiny B a v malém množství také vitamín K a C. Nacházejí se v malých množstvích v buňkách hroznů, ve šťávě a ve víně. Jejich koncentrace klesá obvykle během fermentace a zrání vína. Obsah vitaminů, zejména skupiny B, je obvykle značně vyšší v mladém víně a během skladování vína klesá [19, 32, 34].

Tab. 2 Změny složení minerálních látek a vitamínů před a po zpracování hroznů [16]

Látka	Hrozny (mg.l ⁻¹)	Víno (mg.l ⁻¹)
Vápník	17,50	9,00
Draslík	192,00	80,00
Hořčík	5,57	9,00
Sodík	12,30	3,00
Fosfor	16,16	15,00
Železo	0,27	0,60
Zinek	0,05	stopy
Thiamin	0,04	stopy
Riboflavin	0,02	0,01
Pyridoxin	0,05	0,02
Vitamin C	3,80	0,05
Kyselina nikotinová	0,15	0,00
Kyselina pantothenová	0,06	0,00

2.10 Barviva

Barevné látky ve vínech v podstatě odpovídají i barevným látkám v bobulích hroznů. Jsou to hlavně antokyany, způsobující charakteristické zbarvení červených vín a zelená a žlutá barviva, jako je chlorofyl, flavonové látky, karoteny a xantofyly, kvercetin a kvercitrin, které ovlivňují barvy bílých, ale po částečném vysrážení antokyanů do jisté míry i starších červených vín. Barva antokyanů závisí na kyselosti prostředí. Červená vína s vyšším obsahem kyselin mají světlejší barvu a vína s nižším obsahem kyselin mají barvu tmavě červenou. Červená vína s vyšším obsahem tříslovin mají tmavší rubínově červenou barvu. Při jejich stárnutí se antokyany rychleji rozkládají a barva vín se mění na cihlově červenou [10, 19, 37].

Evropské odrůdy révy vinné (*Vitis vinifera*) obsahují pouze 3-monoglukosidy, americké a jiné druhy, réva pobřežní (*V. riparia*), réva skalní (*V. rupestris*), réva americká (*liščí*, *V. labrusca*) a jejich hybridy s révou vinnou obsahují také odpovídající 3,5-diglukosidy a jejich acylderiváty. Distribuce anthokyanů v červených hroznech révy vinné je velmi proměnlivá a liší se podle druhu, odrůdy a v závislosti řadě dalších podmínek. Stanovení jednotlivých pigmentů se také využívá při chemotaxonomické klasifikaci červených odrůd. Obecně zde převládají deriváty malvidinu. U mimoevropských druhů révy je důležitý malvidin-3,5-β-D-diglukopyranosid. Nositeli červené barvy mladých vín jsou zásadně stejné

pigmenty, které se vyskytují v hroznech, z nichž se vyextrahovaly při fermentaci. Během zrání a staření vín však dochází k významnějším změnám barvy. Klesá množství původních anthokyanů, ale vznikají specifické tmavší a stabilnější červené pigmenty, méně citlivé na změny pH prostředí nebo na odbarvení oxidem siřičitým. Zralá vína jsou proto tmavší než vína mladá [25].

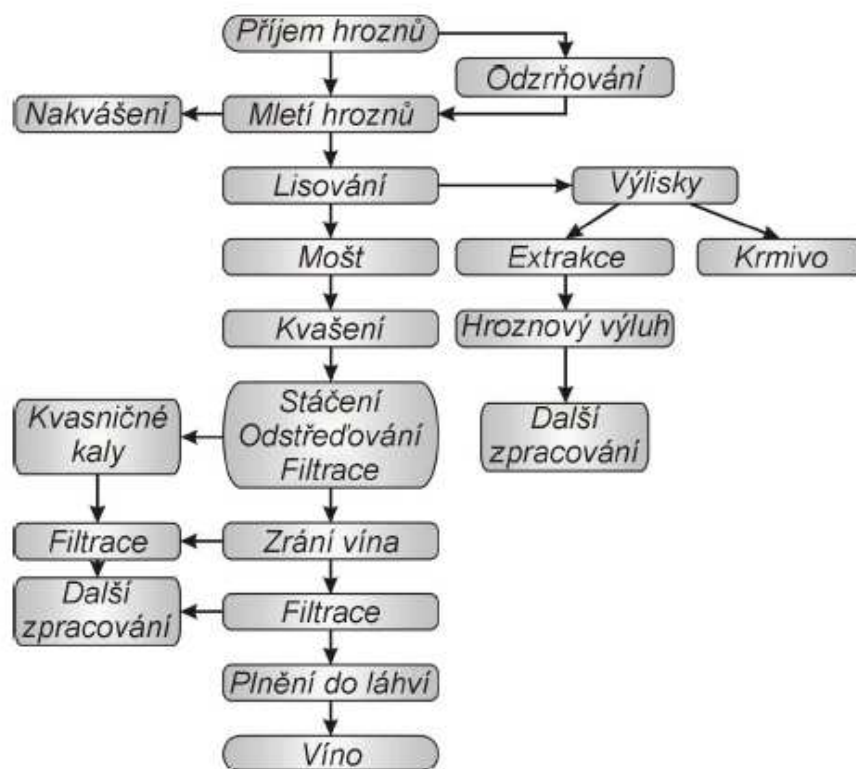
2.11 Další složky vína

Prakticky stálou součástí vína je volná i vázaná kyselina siřičitá, která se jako výborný antioxidační a částečně i konzervační prostředek používá běžně při školení vín. Maximální obsah kyseliny volné i vázané ve víně je dán zákonnými předpisy. Pokud nejsou tyto povolené hodnoty překročeny, není možno kyselinu siřičitou ve vínech obvykle sensoricky rozpoznat. V opačném případě se jedná buď o víno čerstvě sířené, nebo přesířené. U bílých vín je kyselina siřičitá slaběji vázána než ve vínech červených [10].

Oxid siřičitý a některé z jeho sloučenin se používají nejen jako konzervační prostředky, ale také k inhibici reakcí enzymového a neenzymového hnědnutí a k bělení. Mají také antioxidační vlastnosti. Ve vodných roztocích oxidu siřičitého (SO_2 se rozpouští až na 9,5 % roztok při 20°C) vzniká kyselina siřičitá, jejímž anhydridem je oxid siřičitý. Kyselina disociuje do dvou stupňů ($\text{pK}_1 = 1,76$ a $\text{pK}_2 = 7,20$). V závislosti na pH prostředí jsou proto v roztocích (kromě SO_2 a nedisociované kyseliny) přítomny hydrogensířičitanové ionty a siřičitanové ionty. Jako konzervant se uplatňuje nedisociovaná kyselina, jediná forma účinná proti kvasinkám, proto jsou oxid siřičitý a siřičitany účinné v kyselých potravinách ($\text{pH} < 4$). Hlavní aplikace se týkají inhibice růstu octových a mléčných bakterií a divokých kvasinek právě u vín. Oxid siřičitý působí proti některým bakteriím již v koncentracích kolem 1 - 2 mg.l^{-1} , kdy se jedná o bakteriostatický účinek, vyšší koncentrace působí baktericidně [25].

3 TECHNOLOGIE VÝROBY VÍNA

Výrobní proces se moc nemění, základem zůstává kvalita hroznů. Hrozny se sklízají po dosažení žádoucího stupně zralosti. Kritériem pro dosažení technologické zralosti je množství obsahu zkrasitelných cukrů. Základním předpokladem výroby jakostních vín je rychlé zpracování zdravých hroznů na mošt bez zbytečného provzdušňování [9, 13].



Obr. 3 Schéma výroby vína [7]

Při přejímce hroznů se zjišťuje jejich hmotnost, stanovuje se průměrná cukernatost a jakost podle zdravotního stavu, odrůdy a obsahu cukru. Ke zjišťování cukernatosti se používají speciální moštoměry, kterých je několik druhů. V ČR se cukernatost vyjadřuje ve °NM, které udávají množství cukru v kg na 100 l moštu nebo ve °KMW, udávající množství cukru v % hmot. ve 100 l moštu při 20 °C. Údaje jednotlivých moštoměrů se přepočítávají podle tabulek. V automatizovaných linkách se cukernatost zjišťuje zpravidla refraktometricky [5, 10, 38, 39].

Před lisováním hroznů je potřebné pro snadnější uvolnění šťávy z bobulí hrozny rozemlít tak, aby byly odděleny třapiny od bobulí a ty narušeny, čímž vznikne rmut. Drť nebo nebo

rmut z odrůd, které nemají sliznatou dužninu se lisuje bez naležení. Důležité je, aby drť byla po odzrnění zasířena, protože uvolněný SO_2 spolupůsobí při vyluhování aromatických látek [5, 39].

Nakvášení rmutu má význam u aromatických, muškátových a kořeněných odrůd, dále pak u modrých odrůd pro výrobu červených vín. Při teplém počasí se nakvašuje 6 hodin, při chladném 15 - 20 hodin, aby se uvolnilo co nejvíce aromatických látek. Nakvášení se může kombinovat s ošetřením rmutu pektolytickými enzymy pro usnadnění lisování, zvýšení výtěžnosti moštu a zlepšení filtrovatelnosti vína. Dále pak i pro zlepšení vůně a barevnosti moštu i vína. Ve velkovýrobě se rmut nakvašuje v nádržích či tancích s automatickým kvasným procesem [5, 40].

Podle požadovaného typu vína se rozlišují 3 základní možnosti lisování:

1. lisování celých hroznů - pro výrobu bílých vín
2. okamžité lisování odzrněných hroznů - pro výrobu bílých vín z modrých odrůd
3. lisování drti po krátkém naležení - pro výrobu růžových a červených vín [13].

Drť nebo scezený rmut je co nejrychleji, pokud možno ihned po naležení, nezbytné lisovat. Lisováním se odděluje mošt od tuhé části drtě nebo rmutu. Po naplnění do lisu se oddělí samotok, ze kterého je nejjemnější a nejkvalitnější víno. Poté se postupně zvyšuje tlak na lisovanou hmotu až na 1,2 – 2,5 MPa. Výtěžek moštu se pohybuje kolem 70 %. Z celkového výtěžku lze získat 60 % samotoku, 25 % z prvního lisování, 10 % z druhého, případně 5 % z třetího lisování. Na 100 litrů moštu je třeba asi 140 kg hroznů [3, 5, 38, 41].

3.1 Úprava moštu

K ochraně révy vinné proti chorobám a škůdcům se používají různé chemické přípravky, které se mohou vyskytnout i v moštech. Některé z nich mají nepříznivý vliv i na kvašení moštů. Proto je vhodné mošty před kvašením odkalovat. Mošty se odkalují hned po lisování nebo zcezení, dokud nekvasí [3, 5, 9, 41].

Dalším krokem je úprava kyselosti moštu. Víno z nedozrálých hroznů je tvrdé, neharmonicky kyselé a velmi pozdě vyžívá. Jestliže je obsah kyselin tak vysoký, že je nelze odbourat přirozeným jablečno-mléčným kvašením (biologickou cestou), pak je vhodné při-

stoupit k jejich odbourání chemickou cestou. Úprava kyselin v moště odbouráním uhličitanem vápenatým je nejběžnější a nejlevnější chemický způsob odbourávání [5, 41].

Pokud plody nemají dostatečný obsah přirozených cukrů, lze provést tzv. chaptalizaci, tj. přidat do šťávy nebo vinného moštu malé množství cukru. Bez zlepšení moštu z hroznů, které nedosáhly technologické zralosti, by budoucí víno neodpovídalo požadavkům vyplývajícím ze zákona. Proto se nedostatek cukernatosti upravuje docukřením rafinovaným řepným cukrem a příliš kyselé mošty se odkyselí. Na zvýšení cukernatosti jednoho hektolitrů moštu o 1 °Kl je potřeba 1,25 kg cukru. V poslední době se k úpravě moštu a vín používá rovněž zahuštěný mošt, který nahrazuje řepný cukr. Zahuštěný mošt se vyrábí z révo- vých moštů ve vakuových odparkách při teplotě 35 °C a obsahuje 50 - 60% cukru [3, 13, 17, 38].

V české vinařské oblasti, která je dle směrnic ES zařazena do zóny "A" je povoleno zvýšit cukernatost moštu řepným cukrem maximálně o 5,9 °NM a v zóně "B" v moravské vinařské oblasti jen o 4,2 °NM. Doslazovat se má ihned po vylisování, během kvašení je doslazování méně vhodné a následné doslazování s prokvašováním se nedoporučuje. U jakostních vín s přívlastkem je přímo slazení zakázáno, a to jak legislativou ČR tak i EU [41, 42].

Dalším nezbytným technologickým krokem je síření moštu. Z technologického hlediska se musí síření hroznového moštu věnovat mimořádnou pozornost. Ve vinařství je zatím oxid siřičitý nenahraditelný a neexistuje žádný vhodný prostředek, který by úplně nahradil jeho účinek v moštu. Oxid siřičitý působí v moštech redukčně a konzervačně a používá se jen v nezbytném množství. Je účinný proti plísním, bakteriím a aerobním kvasinkám. V mikroflóře moštu potlačuje především divoké kvasinky a tím vytváří podmínky pro kvašení kulturními kmeny kvasinek. Ve vhodných dávkách působí příznivě na tvorbu buketu i chuťových vlastností budoucího vína a ovlivňuje jakost a stabilitu [3, 5, 9, 10, 34, 41].

3.2 Fermentace

Vylisovaný mošt ponecháme samovolně kvasit v sudech, pochází-li ze zdravých a čistých hroznů a nebyly do něj udělány žádné zásahy, které by mohly ovlivnit jeho přirozenou mikroflóru, která se do moštu dostala z hroznů v průběhu lisování. Výhodnější je použití čistých kultur vinných kvasinek, které jsou buď pro běžné kvašení, nebo k rozkvašení moštů

s vysokým obsahem cukru na vyšší obsah alkoholu, či se schopností kvašení v chladném prostředí, popř. v silně zasiřených mošttech. Snadnější je používání vysokovýkonných aktivních suchých vinných kvasinek, které se přímo zamíchají do moštu [3, 5].

Pro fermentaci se využívá různých fermentačních nádob, které mohou být betonové, dřevěné, laminátové nebo vyrobené z nerezové oceli. Kvasné nádoby před plněním prohlédneme, vypláchneme, zasiříme a plníme asi do 3/4 jejich obsahu [5, 6, 38, 43].

Alkoholové kvašení je složitý biochemický proces rozkladu cukru obsaženého v moště na alkohol a oxid uhličitý způsobený kvasinkami. Vzniklý alkohol působí ve vyšších koncentracích konzervačně a prodlužuje údržnost vína, jinak je důležitou součástí chuti a vůně vína. Kvašením se štěpí cukr na alkohol a oxid uhličitý. Dále vznikají při kvašení četné vedlejší produkty, které ovlivňují budoucí charakter vína. Jsou to glycerin, estery, aldehydy, kyseliny aj. [34, 41, 44].

Průběh reakcí alkoholového kvašení je v zásadě tento:

1. fosforylace cukru (vznik fosforečných esterů hexóz),
2. štěpení fosforylovaného cukru na triosy (glyceraldehydfosfát a dihydroxyacetonfosfát),
3. oxidoredukce trios,
4. defosforylace trios,
5. dekarboxylace kyseliny pyrohroznové (vznik acetaldehydu a CO_2)
6. redukce acetaldehydu (vznik ethanolu)

Předpokládá se, že k vlastnímu alkoholovému kvašení se spotřebuje 92 % cukru. K tomu se musí připočítat 2 až 3 % cukru, který spotřebují kvasinky ke svému rozmnožování jako zdroj uhlíku k tvorbě biomasy [45].

Alkoholické kvašení hroznového moštu rozdělujeme na tři fáze, a to na začátek, bouřlivé kvašení a dokvášení [3].

Začátek kvašení trvá 2–3 dny, je charakteristický pozvolným množením kvasinek a pomalým začátkem prokvašování cukrů. Na začátku rozkvášejí mošt divoké kvasinky, které brzdí činnost kulturních vinných kvasinek [36, 46].

Bouřlivé kvašení trvá 2 - 5 dní a prokvasí při něm podstatná část cukru. Pro kvašení moštu je nutné kvasinkám vytvořit vhodné prostředí. Po naplnění moštu do kvasných nádob má velký vliv na kvašení nejen dostatečné množství cukru, ale i teplota. Množení a aktivita kvasinek je nejlepší v rozmezí teploty od 18 do 22 °C. Správný průběh kvasného procesu vyžaduje vhodnou koncentraci roztoku cukru. Nejlépe probíhá kvašení v 8 % až 20 % roztoku cukru. Některé kmeny vinných kvasinek mají možnost prokvasit 30 % až 35 % roztoku cukru a produkují přitom 17 až 18 obj. % etanolu. Roztoky s více než 30 % cukru kvasí již jen velmi slabě a při 50 % koncentraci kvašení již prakticky neprobíhá [5, 6, 38, 41, 45].

Dokvašení je poslední fáze kvašení po poklesu obsahu cukru na 2 – 5 g.l⁻¹ a trvá několik měsíců. Dochází k zastavení činnosti kvasinek, zastaví se vývin oxidu uhličitého, kvasinky sedimentují na dno nádoby a usazují se i kaly [36, 46].

3.3 Školení a ošetřování vín

Po ukončení kvasného procesu probíhá v mladých vínech postupné zrání. Při něm se vinař snaží usměrňovat vývoj s ohledem na kvalitativní zařazení vína a podle představ o konečné jakosti, které by chtěl dosáhnout. Při zrání vína je možno pozorovat změnu obsahu cukrů. Ke zvýšení obsahu dochází u galaktosy, glukózy, fruktózy, xylózy a arabinózy. Tento efekt je obvykle připisán hydrolyze dřevní hemicelulózy s postupným uvolňováním cukrů [35, 41, 47].

Prvním úkolem je zamezit po dokvašení vín přístupu vzdušného kyslíku k vínům pečlivým doplňováním kvasných nádob, aby bylo docíleno co nejmenšího styku dokvašovaného vína se vzduchem. Víno skladované v neplných nádobách oxiduje, ztrácí na jakosti a je náchylné na vady a nemoci. K dolití používáme zdravé víno stejné odrůdy, které máme v zásobě v menších nádobách [5, 6, 10, 41].

Stáčením vína je činnost, při níž víno oddělujeme od kalů. Během zrání víno stáčíme několikrát. První stáčení probíhá zpravidla 30 - 50 dní po bouřlivém kvašení. Ke druhému stočení vína dochází po 6 - 10 týdnech po prvním stočení vína. Stáčení vína je možno spojit se scelováním, čiřením a filtrací. Je nutno si uvědomit, že v této době by mělo víno smyslovými a chemickými hodnotami již odpovídat hotovému výrobku [5, 41, 47].

Dalším krokem je přidavek oxidu siřičitého, který má ve sklepním hospodářství mnohostranné použití. Slouží ke konzervaci moštu a vína, k léčení vadných a nemocných vín, ke zlepšování barvy, k dezinfekci lahví, zátek a sklepních prostorů. Použití oxidu siřičitého je stanoveno zákonnými normami. Pro jednotlivé kategorie vín je omezeno nařízením Evropského společenství č. 822-823/1987 aktualizovaného č. 1493/1999 a č. 1622/2000 [5, 17, 42, 43, 47].

Další možností ošetřování je odkyselování vín. Pokud se neodkyselí již mosty přidavkem jemného uhličitanu vápenatého, musí se upravit vyšší kyselost vína hned po dokvašení. Používá se stejně jako u moštu přidavek uhličitanu vápenatého nebo u dokvašených vín scelování s víny s nižší kyselostí. Při klasické výrobě vín se využívá i biologického odbourávání kyselin bakteriemi mléčného kysání, které odbourávají kyselinu jablečnou na kyselinu mléčnou a oxid uhličitý bez vedlejších produktů, na rozdíl od nečistého mléčného kvašení [5, 41].

Mezi prvním a druhým stáčením vína číříme. Číření je zdravotně nezávadné a naopak lze jím předcházet možnému znehodnocení vína. Je založeno jednak na povrchové adsorpční schopnosti čířidel, jednak na schopnosti se srážet s některými nežádoucími látkami ve víně. Celý proces srážení a usazování trvá zpravidla dva až tři týdny. Zakalení vína se měří nefelometrem a hodnota se vyjadřuje v jednotkách NTU (Nephelometric Turbidity Unit). 1 NTU se rovná zákalu způsobenému 3,2 mg kysličníku křemičitého v 1 litru vody. Jako čířidla se používají: želatina, vyzina, vaječný bílek, mléko a kasein, PVPP (polyvinylpyrrolidon), tanin, agar, bentonit, gel kyseliny křemičité, křemelina, kaolin, španělská hlínka, aktivní uhlí aj.[3, 5, 17, 41, 43, 47].

Jednou z posledních technologických operací je filtrace vín, která spočívá v oddělování pevných částic vína na pórovité stěně filtru. Filtrace urychluje výrobu, zkracuje technologické procesy přípravy vína na lahvování a umožňuje dosáhnout jiskrné čirosti. Nejnověji se prozatím převážně u velkých vinařských firem používají tzv. membránové filtry, které jsou podle konstrukce a zvolené membrány použitelné od hrubé filtrace až po mikrobiální sterilizaci vín. Poprvé se filtruje po vyčiření. Druhá filtrace se často spojuje bezprostředně s lahvováním vína [5, 41, 43].

3.4 Lahvování

Včasné nalahvování vína před jeho vrcholem vývoje zajišťuje jeho vysokou kvalitu. Proces zrání vína pokračuje v láhvi a víno se stává láhvově zralým. Pro lahvování platí základní pravidla. Bílá vína se stáčejí dříve než červená, v některých případech už šest měsíců po sklizni. Plnicí zařízení a láhve musejí být sterilní, aby nedošlo ke kontaminaci a víno se nezkazilo, ještě než otevřeme láhev [38, 41].

4 METODY STANOVENÍ SACHARIDŮ VE VÍNĚ

Ke stanovení sacharidů se využívá celé řady metod, mezi něž patří chromatografické metody - vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), vysokoúčinná aniontově - výměnná chromatografie (HPAEC), plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS), spektroskopie v blízké infračervené oblasti (NIRS), a také enzymatické stanovení.

V této kapitole jsou podrobněji popsány dvě porovnávané metody - technika HPLC s RID detekcí a enzymatické stanovení sacharidů.

4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Mezi metodami kapalinové chromatografie zaujímá významné místo technika HPLC. Metoda HPLC je jednoduchá a nedestruktivní metoda, použitelná pro stanovení prakticky všech cukrů a cukernatých alkoholů. Jedná se o důležitý nástroj pro kontrolu kvality moštů a vína. Pro tzv. kapalinovou chromatografii se používají nejrůznější dělicí principy: dělení může probíhat v systému fází kapalina-kapalina, kapalina-pevná látka, iontově výměnná chromatografie, gelová vylučovací chromatografie aj. [21, 33, 48, 49, 50].

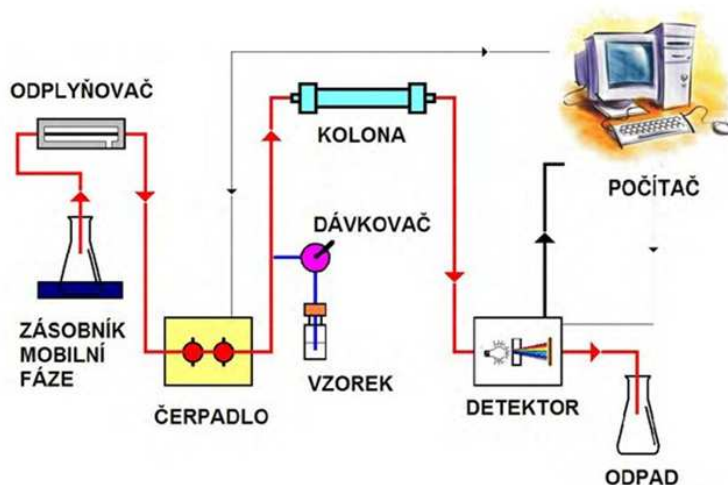
Existuje řada chromatografických metod, dělí se podle mnoha hledisek - např. dle skupenství mobilní fáze, dle uspořádání stacionární fáze, podle povahy děje, který převládá při separaci. V chromatografii se vnáší vzorek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. Vzorek je umístěn na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky s větší afinitou ke stacionární fázi. Tím se složky postupně od sebe separují a na konec stacionární fáze se dříve dostávají složky méně zadržované [50, 51].

4.1.1 Chromatograf HPLC

Zařízení pro HPLC se nazývá kapalinový chromatograf. Přístroje pro HPLC jsou mnohem složitější než pro klasickou sloupcovou LC, kde se mobilní fáze pohybuje gravitační silou. Mezi základní požadavky na chromatografické zařízení: patří: umožnit pravidelný a konstantní tok mobilní fáze stacionární fází; zajistit kvantitativní a časově co nejkratší nadávkování analyzované směsi na stacionární fázi; vytvořit podmínky k co největšímu počtu

opakování sorpčních a desorpčních procesů jako výsledku vzájemných vztahů mezi stacionární fází, molekulami složek mobilní fáze a molekulami solutů v analyzované směsi; uskutečnit měření a zaznamenávání změn určitých vlastností tekoucí mobilní fáze, které jsou výsledkem přítomnosti separovaných látek; zařízení musí být schopné selektivně uve-
dené změny analyzovat a kvantifikovat [51, 54, 55, 60, 61, 62].

Základní technické vybavení se skládá ze zásobníku mobilní fáze, čerpadla, dávkovacího zařízení, předkolony, kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení [53, 54].



Obr. 4 Schéma HPLC[54]

Čerpadlo zajišťuje stálý průtok mobilní fáze. Většina pump je konstruována na maximální pracovní tlak kolem 40 MPa (400 barů). Díky pumpě je možné upravovat průtok a tlak mobilní fáze v systému. Průtok by měl být konstantní, bezpulsní a reprodukovatelný a jeho hodnoty by se měly pohybovat v $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ pro kapilární kolony a v $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ pro mikronáplňové kolony. Podle rychlosti průtoku se čerpadla dělí na vysokoprůtoková, konvenční a nízkoprůtoková. V HPLC se používají izokratické a gradientové čerpadla. U izokratických je mobilní fáze čerpána pouze z jedné zásobní láhve, vzniká tzv. izokratická eluce, při níž se mobilní fáze během analýzy nemění. Použitím gradientových čerpadel je mobilní fáze čerpána z více zásobních lahví a proto se může měnit složení mobilní fáze během analýzy. Součástí každého moderního HPLC čerpadla je odplyňovač, který zbavuje kapalinu veškerých plynných směr [51, 54, 61].

Dávkovací zařízení - z čerpadla protéká mobilní fáze do dávkovacího zařízení. Konstrukce dávkovacího zařízení může významně ovlivnit účinnost separace, neboť při nedokonalém dávkování může docházet k významnému rozšiřování elučních zón vlivem mimokolonového příspěvku dávkovacího zařízení [54, 55, 62].

Předkolony slouží k zachycení látek, které by mohly ovlivňovat kolonu. Je konstruována jako krátká samostatná kolona umístěna před hlavní kolonou.

Analytické kolony bývají vyrobeny nejčastěji z oceli. Mohou mít různé parametry, ale délka kolony se nejčastěji pohybuje mezi 10-500 mm, šířka 3,0-25 mm. Kolona se skládá z pláště - nejčastěji se používají pláště z nerez oceli. Nevýhodou je ovšem jejich nízká chemická odolnost. Dále také pláště z tvrzeného skla, na které nemohou působit vysoké tlaky. Je nutné je chránit např. plastovým, kovovým nebo teflonovým obalem. Hlavní částí kolony je náplň, která je tvořena sorbenty s různě modifikovaným povrchem podle potřeby [51, 54, 55, 61].

U HPLC prochází eluát vytékající z kolony průběžně detektorem, který je vestavěn do jejího výtoku. Detektor pak automaticky a kontinuálně měří některou z fyzikálních vlastností eluátu, např. absorpci v UV nebo VIS části spektra (spektrofotometrické UV-VIS detektory), fluorescenci (fluorescenční detektory), vodivost (vodivostní detektory), index lomu (refraktometrický detektor) apod. Pro detekci látek schopných oxidace nebo redukce se používá elektrochemických detektorů, pracujících na coulometrickém principu. V HPLC neexistuje univerzální detektor [33, 50, 60, 61, 62].

Téměř všechny typy detektorů používané v kapalinové chromatografii jsou koncentračního typu, tj. poskytující signál úměrný koncentraci detekovaných látek v eluátu. Rozdělují se do dvou skupin: selektivní detektory, jejichž signál je úměrný koncentraci samotné detekované látky (fotometrické, fluorimetrické a elektrochemické detektory) a univerzální nespecifické detektory, jejichž odezva je úměrná určité celkové vlastnosti eluátu (refraktometrický detektor) [56].

Cukry absorbují v UV oblasti při nízkých vlnových délkách, takže tento systém detekce se u cukrů nevyužívá. Podobně není možné použít citlivé fluorescenční detektory. Je sice možné připravit příslušné deriváty v postkolonových reaktorech, potom se však ztrácí význam kapalinové chromatografie, kdy není třeba připravovat těkavé deriváty, jako při plynové chromatografii [21].

Refraktometrický detektor (refractive index detector, RID) - diferenciální refraktometr je jedním z mála univerzálních detektorů pro kapalinovou chromatografii. Detekce je založena na měření indexu lomu čisté mobilní fáze a eluentu. Detekční limit pro tento detektor je v řádu mikrogramů. Mobilní fáze a vzorky musí být zbaveny rozpuštěných plynů, protože plyny zcela ruší detekci. Značnou nevýhodou tohoto detektoru je, že není možné jej používat při gradientové eluci a také to, že je poměrně málo citlivý. Pro stanovení sacharidů je však vhodný. Index lomu je veličina závislá na teplotě, takže při použití refraktometrického detektoru je podmínkou přesné temperování. Kromě konstantní teploty je nutné v průběhu měření pracovat při specifické vlnové délce [21, 54, 57].

Fotometrický detektor (UV/VIS) - tyto detektory jsou založeny na principu měření absorpance eluátu, který vychází z kolony. Monosacharidy jsou měřeny při vlnových délkách 210, 228, 254 a 260 nm. Použití UV/VIS detektoru se omezuje na deriváty cukrů, které obsahují v molekule vhodný chromofor, například aromatický kruh. Samotné cukry lze detekovat velmi obtížně, protože absorbují mezi 188-192 nm, tedy v oblasti kde absorbují také běžná rozpouštědla [54, 57].

Hmotnostní detektor - tento typ detekce je výhodný, protože umožňuje nejen vysoce citlivou detekci látky vycházející z kolony, ale také ve značné míře její identifikaci, popřípadě informaci o struktuře [49, 54].

Kromě uvedených detektorů existuje řada dalších detektorů, například elektrochemické detektory, nefelometrické detektory, radiochemické detektory a další, které se však pro stanovení sacharidů používají výjimečně [49, 54].

Součástí chromatografu je i software, který slouží k nastavení měřících parametrů a k vyhodnocení chromatogramů. Záznamové zařízení převádí nadetekovaný signál na změnu napětí (mV), kterou zapisovač vynese do grafu oproti retenčnímu času. Integrátor spočítá plochu pod křivkou grafu, která odpovídá množství látky v objemu vzorku daném dávkovací smyčkou. Získané hodnoty o množství se dále převádějí a zpracovávají na koncentrační jednotky. Výsledkem HPLC analýzy je chromatogram. Pokud je analyzovaná směs dobře rozdělena, pak každé složce směsi odpovídá jeden pík [51, 54].

4.1.2 Stacionární fáze

Při chromatografickém stanovení cukrů s nižší molární hmotností, tj. monosacharidů a oligosacharidů, se nejčastěji uplatňuje dělení na katexech, kde jako protiionty jsou vázány kationty kovů, např. vápenaté, stříbrné nebo olovnaté ionty. Další velice častá chromatografická náplň je silikagel modifikovaný aminopropylovou skupinou. V posledních letech se stala velice populární, avšak finančně náročná chromatografie na anexech, která používá k detekci elektrochemický detektor. Na principu adsorbční chromatografie je cukry také možno separovat na nemodifikovaném silikagelu nebo silikagelu s oktadecylovou vázanou fází, v tom případě je lépe separovat deriváty cukrů [21, 49].

4.1.3 Mobilní fáze

Mobilní fáze v kapalinové chromatografii není inertní a významně se podílí na separačním procesu. Složení může být ovlivněno změnami složení rozpouštědel, iontové síly, iontově párovými činidly a pH. Mobilní fáze je charakterizována především svou polaritou a selektivitou. Jako mobilních fází se nejčastěji používá vodných roztoků jednoho či více organických rozpouštědel, nejčastěji metanolu, acetonitrilu a tetrahydrofuranu [53, 54, 55].

Pro stanovení sacharidů se nejčastěji používá deionizovaná voda, směs acetonitril – voda v různém poměru, nejčastěji s 60 – 80 % acetonitrilu a s průtokem od 1,0 do 1,5 ml/min, aby nedošlo k překročení povoleného pracovního tlaku. Dále se používá směs acetonitril-voda v poměru 1 : 2,6 s přídavkem 0,03 % ethylendiaminu. Lze použít i vodný roztok NaOH, který může obsahovat octan sodný nebo se používá zředěná H_2SO_4 [53, 54, 55, 56].

4.2 Enzymatické stanovení

Enzymové metody patří mezi metody, u kterých je výhodou jejich jednoduchost a rychlost analýzy. Enzymové metody jsou v podstatě dvojího typu:

1. analýzy stanovující látky, které mohou být transformovány enzymy, takové látky jsou vlastně metabolity živých organismů a slouží jako substráty enzymů
2. metody stanovující aktivitu enzymů, aktivita enzymů je měřena jako rychlost úbytku reaktantu nebo rychlost vzniku konečného produktu [21, 56].

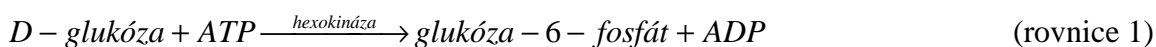
Pomocí enzymů lze kvalitativně i kvantitativně stanovovat běžné monosacharidy a oligosacharidy, škrob, vlákninu, β -glukany, alditoly, aj. i ve značně komplikovaných směsích [21, 56, 57].

Zřejmě nejdelsí tradici mají právě enzymové metody sloužící ke stanovení cukrů. Pro stanovení běžných monosacharidů a oligosacharidů se dnes nejčastěji používají komerčně dostupné enzymové soupravy (obsahující oxidázy a dehydrogenázy), také tlumivé roztoky, které zaručí optimální pH enzymové reakce. Sloučeniny vzniklé enzymovou reakcí se analyzují obvykle spektrálně, elektrochemicky, polarimetricky, titračně, eventuálně pomocí radioaktivních isotopů [21, 57].

K enzymatickému stanovení se používají roztoky čiré, bezbarvé, neobsahující rozpuštěné plyny a s neutrálním pH. Z těchto důvodů je potřeba upravit vodné extrakty pevných vzorků nebo potravinářské roztoky podle daných zásad, např. k vysrážení bílkovin se využívá čiření pomocí Carrezových roztoků. Barviva mohou být odstraněna adsorpcí na polyvinylpyrrolidinu nebo na polyamidu. U slabě zbarvených roztoků je možné nastavit hodnotu slepého pokusu na spektrometru pomocí barevného roztoku vzorku. Tuky se odstraňují extrakcí horkou vodou. Převedení vzorku do roztoku je možno urychlit rozpuštěním preparátu v malém množství dimethylsulfoxidu a pak ve vodě [21, 57].

Pro stanovení sacharidů se používá metoda s glukózaoxidázou, s glukózodehydrogenázou a s hexokinázou. U glukózaoxidázové reakce se glukóza přítomná ve vzorku oxiduje glukózaoxidázou na glukonolakton a peroxid vodíku. Peroxid vodíku se poté stanoví např. Trinderovou reakcí s fenolem a 4-aminoantipyrinem v přítomnosti peroxidázy za vzniku chinonmonoiminového barviva. Glukózodehydrogenázová metoda je založena na oxidaci glukózy v přítomnosti NAD^+ pomocí glukózodehydrogenázy na glukonolakton a redukci NAD^+ na NADH. Tato metoda ale není příliš využívána [21, 56, 57].

Další enzymatickou metodou je níže uvedená hexokinázová metoda, při které se ke stanovení glukózy používá směs enzymů hexokinázy a glukózo-6-fosfát dehydrogenázy:



D-glukóza je fosforylována na D-glukóza-6-fosfát (G-6-P) za přítomnosti enzymu hexokinázy (HK) a ATP. ATP při fosforylaci glukózy přechází na adenosin-5'-difosfát ADP (rovnice 1). V přítomnosti enzymu glukóza-6-fosfát dehydrogenázy (G6P-DH) se glukóza oxiduje pomocí nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADP^+) na D-glukonát-6-fosfát. NADP^+ současně přechází na redukovanou formu NADPH. Množství NADPH vzniklé během reakce je ve stechiometrickém poměru k D-glukóze. Přírůstek koncentrace NADPH se měří změnou absorbance při 334, 340 nebo 365 nm. Hexokináza v rovnici 1 není specifická. Jsou-li v roztoku přítomné fruktóza, mannóza, budou také převedeny na fosfáty. Oxidace glukózy enzymem G6P-DH v přítomnosti NADPH a vznik jeho redukované formy je již specifická reakce. Koncentraci fruktózy respektive fruktózy-6-fosfátu se stanoví po přeměně na glukózu-6-fosfát pomocí fosfoglukózoizomerázy jako zvýšení koncentrace NADPH po oxidaci glukózy-6-fosfátu na 6-glukonovou kyselinu. Navýšení koncentrace NADPH měříme pomocí UV/VIS-spektrofotometru jako absorbanci při vlnové délce 340 nm [21, 56, 57, 58, 60, 61, 62].

Stanovení glukózy a fruktózy vedle sebe spočívá v převedení těchto cukrů na fosfáty, oxidaci glukózy na D-glukonát-fosfát, následuje izomerace fruktóza-6-fosfátu (F-6-P) pomocí enzymu izomerázy (PGI) na glukóza-6-fosfát a pak opět proběhne oxidace G-6-P na D-glukonát-fosfát (rovnice 3,4,5,6). První změna absorbance je úměrná množství glukózy a druhá změna absorbance je úměrná množství fruktózy [21, 57, 61, 62].



II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo pomocí dvou metod stanovit obsah glukózy a fruktózy ve vzorcích červených a bílých vín, a to pomocí techniky HPLC s RID detekcí a enzymatickým stanovením.

1. Formou literární rešerše charakterizovat révu vinnou a vybrané odrůdy červených a bílých vín, popsat chemické složení hroznů a vína, stručně shrnout technologii výroby a dále popsat použité techniky stanovení.
2. Provést měření obsahu glukózy a fruktózy u vybraných vzorků červených a bílých vín pomocí techniky HPLC s RID detekcí a enzymaticky, porovnat výsledky měření a metody použité pro tato stanovení.

6 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

Vzorky 9 bílých (B) a 6 červených (Č) vín byly poskytnuty firmou Zámecké vinařství Bzenec s.r.o., ČR. Seznam vzorků vín je uvedený v Tab.3:

Tab. 3 Analyzované vzorky vín

Číslo vzorku	Druh vína	Zkratka	Charakteristika
1.	Aurelius	AUR	výběr z hroznů B 2012
2.	Děvín	DĚV	pozdní sběr B 2012
3.	Muškat moravský	MM	pozdní sběr B 2012
4.	Tramín červený	TČ	výběr z hroznů B 2012
5.	Rulandské bílé	RB	výběr z hroznů B 2012
6.	Chardonnay	CHAR	pozdní sběr B 2012
7.	Sauvignon	SG	pozdní sběr B 2012
8.	Ryzlink rýnský	RR	pozdní sběr B 2012
9.	Müller Thurgau	MT	pozdní sběr B 2012
10.	Modrý Portugal	MP	pozdní sběr Č 2012
11.	Frankovka	ZW	pozdní sběr Č 2012
12.	Cuvée červené	CUVČ	jakostní Č 2012
13.	Rulandské modré	RM	výběr z hroznů Č 2012
14.	Cabernet Sauvignon	CS	výběr z hroznů Č 2012
15.	Zweigeltrebe	ZW	výběr z hroznů Č 2012

6.1 Přístroje a pomůcky

- kapalinový chromatograf HPLC YL9100 s refraktometrickým detektorem (Young Lin Instrument Co., Korea)
 - kolona SUPELCOSIL LC-NH₂, (5μm, 25 cm x 4,6 mm, Sigma – Aldrich, USA)
 - dávkovací ventil Autosampler YL 9150
 - vakuový degasser YL 9101
 - kvartérní vakuová pumpa YL 9110
 - kolonový termostat YL 9130

- RID detektor YL 9170
- PC s vyhodnocovacím programem Clarity (YL, Korea)
- analytické váhy AND HA – 180M (AND Company, Japonsko)
- Spektrofotometr Libra S12 (Biochrom Ltd., Anglie)
- laboratorní sklo
- filtrační materiál (Syringe Filters Cell., 0,45 μ m, 25 mm, Anglie)

6.2 Chemikálie, referenční a jiné materiály

- Acetonitril pro HPLC (Sigma – Aldrich, USA)
- Metanol pro HPLC (Sigma – Aldrich, USA)
- Glukóza (standard, ChemService – West Chester, USA)
- Fruktóza (standard, ChemService – West Chester, USA)
- Soupravy pro stanovení D-glukózy a D-fruktózy (Megazym, Irsko):
 - I. Imidazolový pufr (2M, pH 7,6), chlorid hořečnatý (100mM) a azid sodný (0,02 % w/v)
 - II. NADP⁺, ATP
 - III. Hexokináza (425 U/ml), suspenze glukózo-6-fosfát dehydrogenázy (212 U/ml),
 - IV. Suspenze fosfoglukózo izomerázy (1 000 U/ml)
 - V. Standardní roztok D-glukózy a D-fruktózy (0,2 mg/ml)

7 METODIKA STANOVENÍ

Obsah glukózy a fruktózy se stanovoval technikou HPLC s refraktometrickou detekcí a enzymaticky.

7.1 Stanovení sacharidů pomocí HPLC s RID detekcí

Byla připravena kalibrační křivka standardu glukózy a fruktózy v roztoku mobilní fáze acetonitrilu a vody v poměru 25:75 v koncentrační řadě 20 g.l^{-1} , 10 g.l^{-1} , 5 g.l^{-1} , $2,5 \text{ g.l}^{-1}$, $1,25 \text{ g.l}^{-1}$, $0,625 \text{ g.l}^{-1}$.

Úprava vzorku vína spočívala ve filtraci přes SPE kolonu a mikrofiltr o hustotě $45 \mu\text{m}$ do vialky. Separace glukózy a fruktózy v reálném vzorku vína probíhala na křemenné koloně s vázaným alkylaminem SUPELCOSIL LC-NH₂. Mobilní fáze byla použita ve složení ACN : H₂O v poměru 75 : 25. Objem nástřiku vzorku do HPLC činil $10 \mu\text{l}$. Eluce proběhla izokraticky při teplotě kolony $35 \text{ }^\circ\text{C}$ a průtoku mobilní fáze $1,5 \text{ ml/min}$.

Detekce glukózy a fruktózy byla provedena pomocí refraktometrického detektoru, kdy glukóza byla detekována v rozmezí od 4,075 do 5,392 minuty, fruktóza v rozmezí od 3,767 do 4,863 minuty. Na základě retenčních časů se podle kalibrační křivky přiřadili k příslušným píkům konkrétní sacharidy a výsledek se následně kvantitativně vyhodnotil pomocí kalibrační křivky. K vyhodnocení výsledků byl použit chromatografický software YLClarity.

Analýza vzorku trvala 12 minut. Každý vzorek byl proměřen třikrát, výsledek byl uveden jako obsah glukózy a fruktózy v g.l^{-1} , s přesností na dvě desetinná místa.

Metoda je validovaná a výsledky jsou uvedeny v dokumentu O.I.V. - Compendium of international methods of wine and must analysis, 2011 [57].

Opakovatelnost metody je definována jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek opakovatelnosti (podmínky, kdy navzájem nezávislé výsledky zkoušek se získají opakovaným použitím téže zkušební metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, týměž pracovníkem za použití týchž přístrojů a zařízení, během krátkého časového rozmezí). Dle O.I.V je opakovatelnost (r) u techniky HPLC stanovena při obsahu glukózy a fruktózy nad 5 g.l^{-1} 3 %, při obsahu $2 - 5 \text{ g.l}^{-1}$ 8 % [57].

7.2 Stanovení sacharidů enzymaticky

D-glukóza a D-fruktóza se fosforyluje enzymem hexokinázou (HK) a adenosin-5'-trifosfátem (ATP) na glukózo-6-fosfát (G-6-P) a fruktózo-6-fosfát (F-6-P) za současné tvorby adenosin-5'-difosfátu (ADP). V přítomnosti glukózo-6-fosfát-dehydrogenázy (NADP^+) na glukonát-6-fosfát za současného vzniku redukovaného nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (NADPH). Množství NADPH, vytvořené při této reakci, je stechiometrické vůči množství D-glukózy a měří se pomocí absorpance světla při 340 nm. Po dokončení reakce se F-6-P přemění pomocí fosfoglukózo-izomerázy (PGO) na G-6-P. G-6-P reaguje znovu s NADP^+ a tvoří glukonát-6-fosfát a NADPH. Množství takto vytvořeného NADPH je stechiometrické vůči množství D-fruktózy.

Pro vytěsnění CO_2 z vína byly vzorky vloženy na 5 minut do ultrazvukové lázně. U červených vín bylo provedeno projasnění vzorků pomocí roztoků Carrez I, Carrez II. Aby bylo možné vzorek proměřit muselo se množství cukru (D-glukózy a D-fruktózy) v kyvetě pohybovat v množství od 0,04 do 0,80 g.l^{-1} . Roztok vzorku bylo proto nutno dostatečně zředit. Vzorky Modrý Portugal, Frankovka, Cuvée červené, Rulandské modré, Cabernet Sauvignon nebylo potřeba ředit. U vzorků Děvín, Ryzlink rýnský, Zweigeltrebe, Chardonnay a Müller Thurgau byl použit faktor ředění 10. U vzorků Muškát Moravský, Sauvignon, Aurelius, Tramín červený a Rulandské bílé byl použit faktor ředění 100.

Spektrofotometr byl nastaven na vlnovou délku 340 nm, kyveta: dráha světla 1,00 cm; teplota: 25° C; roztok vzorku: 4 - 80 μg D-glukózy + D-fruktózy na kyvetu

Do kyvety bylo napipetováno pro slepý vzorek 2,10 ml destilované vody; 0,10 ml imidazolového pufru a 0,10 ml roztoku NADP + ATP a pro reálný vzorek 2,00 ml destilované vody; 0,10 ml vzorku vína; 0,10 ml imidazolového pufru a 0,10 ml roztoku NADP+ATP. Po 3 minutách byla odečtena absorpance roztoků (A_1). Reakce byla odstartována přidávkem suspenze (HK/G-6-P DH) v množství 0,2 ml pro slepý i reálný vzorek. Po 5 minutách byla znovu odečtena absorpance roztoků (A_2). Poté byla přidána suspenze (PGI) v množství 0,2 ml pro slepý i reálný vzorek a na konci reakce se po 8 až 10 minutách změřila absorpance roztoků (A_3).

Byl stanoven rozdíl absorbancí ($A_2 - A_1$) pro slepý vzorek a reálný vzorek a byl odečten rozdíl absorbancí slepého vzorku od rozdílu absorbancí reálného vzorku a byl získán $\Delta A_{\text{D-glukózy}}$. Následně byl stanoven rozdíl absorbancí ($A_3 - A_2$) pro slepý vzorek i reálný vzorek

a byl odečten rozdíl absorbancí slepého vzorku od rozdílu absorbancí reálného vzorku a byl získán $\Delta A_{D\text{-fruktózy}}$.

Koncentrace D-glukózy v g.l^{-1} byla vypočtena dle vzorce:

$$c = \frac{V * M}{\varepsilon * d * v} * (A_2 - A_1)$$

Koncentrace D-fruktózy v g.l^{-1} byla vypočtena dle vzorce:

$$c = \frac{V * M}{\varepsilon * d * v} * (A_3 - A_2)$$

kde:

- V konečný objem (ml)
- M molekulová hmotnost dané látky
- ε extinční koeficient NADH při 340 nm = 6300 ($\text{l.mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)
- d dráha světla (cm)
- v objem vzorku (ml)

Byl-li roztok v průběhu přípravy zředěn, musel se výsledek vynásobit faktorem ředění F. U vzorků Děvín, Ryzlink rýnský, Zweigeltrebe, Chardonnay a Müller Thurgau byl použit faktor ředění 10. U vzorků Muškát Moravský, Sauvignon, Aurelius, Tramín červený a Rulandské bílé byl použit faktor ředění 100.

Metoda je validovaná a výsledky jsou uvedeny v dokumentu O.I.V. - Compendium of international methods of wine and must analysis, 2011 [57].

Opakovatelnost metody je definována jako rozdíl mezi výsledky více stanovení při souběžném nebo krátce po sobě opakovaném postupu, jež dělal jeden pracovník za stejných podmínek. Dle O.I.V je opakovatelnost (r) u enzymatického stanovení: $r = 0,056 * x$, kde x – koncentrace glukózy nebo fruktózy v g.l^{-1} [57].

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

8.1 Stanovení glukózy a fruktózy technikou HPLC-RID

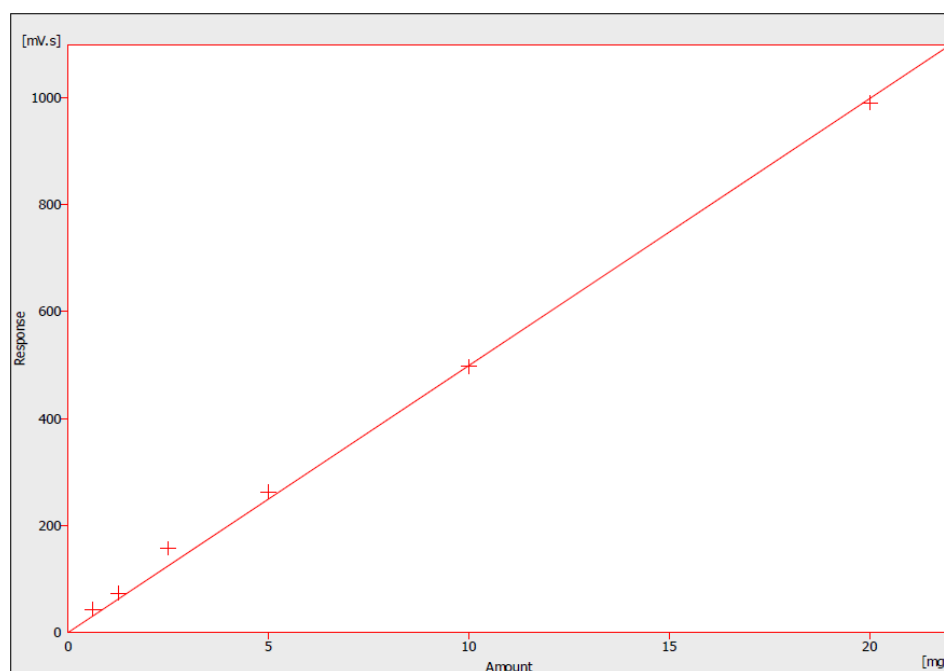
Vzorky vín (Tab. 3) byly technikou HPLC s RID detekcí analyzovány vždy třikrát za podmínek stanovených v kapitole 7.1.

8.1.1 Kalibrační křivka glukózy

Kalibrační křivka pro glukózu byla měřena postupem uvedeným v kapitole 7.1.

Tab. 4 Závislost plochy píku na koncentraci glukózy

Koncentrace (g.l^{-1}), Amount	Plocha píků (mV.s^{-1}), Response
0,625	43,4697
1,25	73,6707
2,5	157,3259
5	262,4470
10	497,4848
20	989,6541



Obr. 5 Kalibrační křivka glukózy (g.l^{-1})

Pro sestavení kalibrační křivky byly použity standardy glukózy o koncentraci 20 g.l⁻¹; 10 g.l⁻¹; 5 g.l⁻¹; 2,5 g.l⁻¹; 1,25 g.l⁻¹; 0,625 g.l⁻¹. Kalibrační křivka vyjadřuje závislost plochy píku (mV.s) na koncentraci glukózy v g.l⁻¹ (Tab. 4).

Sestrojená kalibrační křivka (Obr. 5) pro glukózu má rovnici regrese: $y = 49,8735...x$

kde:

y ... plocha píku (mV.s⁻¹)

x ... obsah glukózy (g.l⁻¹)

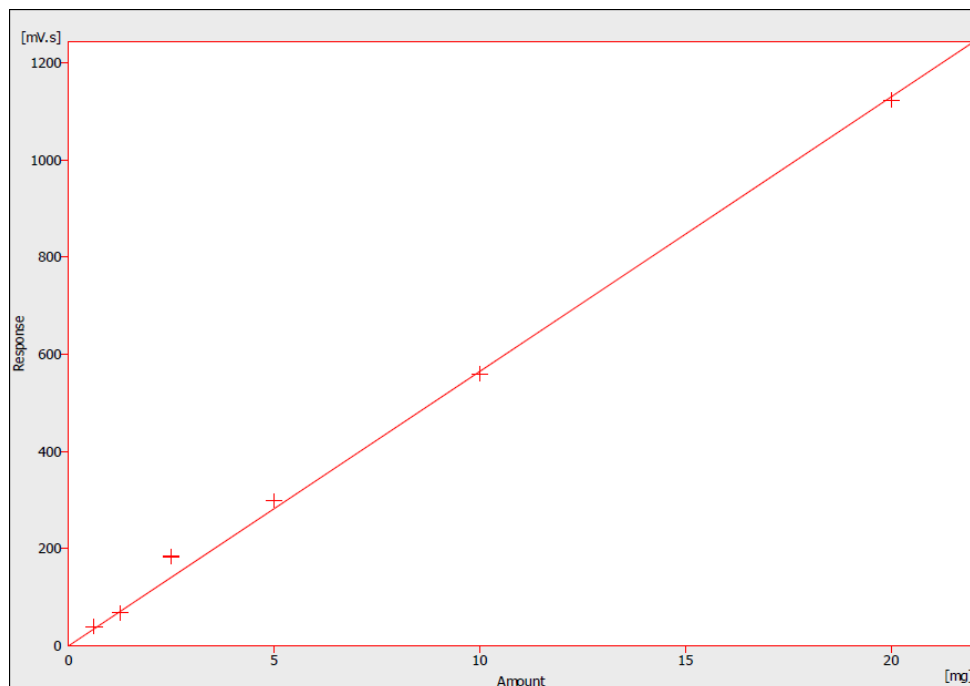
Korelační koeficient závislosti plochy píku na obsahu glukózy: $R = 0,9994$.

8.1.2 Kalibrační křivka fruktózy

Kalibrační křivka pro fruktózu byla měřena postupem uvedeným v kapitole 7.1

Tab. 5 Závislost plochy píku na koncentraci fruktózy

Koncentrace (g.l ⁻¹), Amount	Plocha píků (mV.s ⁻¹), Response
0,625	38,0659
1,25	84,7888
2,5	177,6990
5	289,0679
10	543,2063
20	1087,4408



Obr. 6 Kalibrační křivka fruktózy (g.l^{-1})

Pro sestavení kalibrační křivky byly použity standardy fruktózy o koncentraci 20 g.l^{-1} ; 10 g.l^{-1} ; 5 g.l^{-1} ; $2,5 \text{ g.l}^{-1}$; $1,25 \text{ g.l}^{-1}$; $0,625 \text{ g.l}^{-1}$. Kalibrační křivka vyjadřuje závislost plochy píku (mV.s) na koncentraci fruktózy v g.l^{-1} (Tab. 5).

Sestrojená kalibrační křivka pro fruktózu (Obr. 6) má rovnici regrese: $y = 54,8638 \dots x$

kde:

y ... plocha píku (mV.s^{-1})

x ... obsah fruktózy (g.l^{-1})

Korelační koeficient závislosti plochy píku na obsahu fruktózy: $R = 0,9997$.

8.1.3 Výsledky stanovení technikou HPLC s RID detekcí

Tab. 6 Výsledky HPLC stanovení glukózy a fruktózy u bílých vín

Vzorek	1. měření		2. měření		3. měření		Průměr Glu (g.l ⁻¹)	S glu	Průměr	
	Glu (g.l ⁻¹)	Fru (g.l ⁻¹)	Glu (g.l ⁻¹)	Fru (g.l ⁻¹)	Glu (g.l ⁻¹)	Fru (g.l ⁻¹)			Fru (g.l ⁻¹)	S fru
AUR	1,98	32,05	1,96	32,09	2,03	32,01	1,99	0,04	32,05	0,04
DĚV	0,33	0,98	0,33	0,98	0,32	0,97	0,33	0,01	0,97	0,01
MM	1,06	9,99	1,06	10,02	1,09	10,01	1,07	0,02	10,01	0,02
TČ	5,52	37,14	5,56	37,21	5,61	37,09	5,56	0,05	37,15	0,06
RB	0,63	14,15	0,69	14,15	0,63	14,15	0,65	0,03	14,15	0
CHAR	0,61	6,19	0,62	6,13	0,62	6,19	0,62	0,01	6,17	0,03
SG	0,32	7,78	0,30	7,81	0,32	7,81	0,31	0,01	7,80	0,02
RR	0,26	1,60	0,26	1,61	0,26	1,62	0,26	0	1,61	0,01
MT	0,37	3,88	0,37	3,88	0,36	3,90	0,37	0,01	3,88	0,01

Z výsledků uvedených v Tab. 6 je zřejmé, že u všech vzorků bílých vín, převažovala v obsahu zbytkového cukru fruktóza nad glukózou.

Nejvyšší obsah fruktózy byl stanoven u vzorků vín Tramín červený (37,15 g.l⁻¹) a Aurelius (32,05 g.l⁻¹), nejnižší obsah fruktózy byl technikou HPLC stanoven u vzorků vín Děvín (0,97 g.l⁻¹) a Ryzlink rýnský (1,61 g.l⁻¹).

Nejvyšší obsah glukózy byl stanoven také u vín Tramín červený (5,56 g.l⁻¹) a Aurelius (1,99 g.l⁻¹), naopak nejnižší obsah glukózy byl technikou HPLC stanoven u vzorku vín Ryzlink rýnský (0,26 g.l⁻¹) a Sauvignon (0,31 g.l⁻¹).

U vzorků s vyšším obsahem glukózy a fruktózy - Aurelius, Tramín červený, Rulandské bílé a Chardonnay byly směrodatné odchylky u stanovení pomocí HPLC v rozpětí od 0,03 do 0,06. U vzorků obsahujících nižší obsah glukózy a fruktózy byly směrodatné odchylky v rozpětí od 0 do 0,01.

Tab. 7 Výsledky HPLC stanovení glukózy a fruktózy u červených vín

Vzorek	1. měření		2. měření		3. měření		Průměr Glu (g.l ⁻¹)	S glu	Průměr		S fru
	Glu (g.l ⁻¹)	Fru (g.l ⁻¹)	Glu (g.l ⁻¹)	Fru (g.l ⁻¹)	Glu (g.l ⁻¹)	Fru (g.l ⁻¹)			Fru (g.l ⁻¹)		
MP	0,26	0,40	0,28	0,40	0,28	0,40	0,27	0,01	0,40	0	
FR	0,33	0,04	0,33	0,04	0,33	0,04	0,33	0	0,04	0	
CUVČ	0,52	0,03	0,52	0,03	0,50	0,08	0,51	0,01	0,05	0,03	
RM	0,42	0,16	0,42	0,19	0,41	0,16	0,42	0,01	0,16	0,02	
CS	0,15	0,26	0,15	0,25	0,15	0,25	0,15	0	0,26	0,01	
ZW	0,28	1,77	0,29	1,78	0,28	1,77	0,28	0,01	1,78	0,01	

U vzorků červených vín (Tab. 7) převládala fruktóza nad glukózou u vzorků Modrý Portugal, Cabernet Sauvignon a Zweigeltrebe. Obsah glukózy byl oproti fruktóze vyšší u vzorků Frankovka, Cuvée červené a Rulandské modré.

Nejvyšší obsah fruktózy byl stanoven u vzorků vín Zweigeltrebe (1,78 g.l⁻¹) a Modrý Portugal (0,40 g.l⁻¹), naopak nejnižší obsah fruktózy u vín Frankovka (0,04 g.l⁻¹) a Cuvée červené (0,05 g.l⁻¹). Nejvyšší obsah glukózy byl stanoven technikou HPLC u vína Cuvée červené (0,51 g.l⁻¹) a Rulandské modré (0,42 g.l⁻¹), nejnižší obsah glukózy u vzorku vína Cabernet Sauvignon (0,15 g.l⁻¹) a Modrý Portugal (0,27 g.l⁻¹).

Směrodatné odchylky vykazují nízký rozptyl od průměrných hodnot (od 0 do 0,03).

Tab. 8 Výsledky HPLC stanovení celkových cukrů u bílých vín

Vzorek	1. měření	2. měření	3. měření	Průměr (g.l ⁻¹)	S	r
	∑ Glu + Fru (g.l ⁻¹)	∑ Glu + Fru (g.l ⁻¹)	∑ Glu + Fru (g.l ⁻¹)			
AUR	34,03	34,05	34,05	34,04	0,01	2,72
DĚV	1,31	1,31	1,29	1,30	0,01	0,04
MM	11,05	11,08	11,10	11,08	0,03	0,09
TČ	42,66	42,77	42,70	42,71	0,06	3,42
RB	14,78	14,84	14,78	14,80	0,03	1,18
CHAR	6,80	6,75	6,81	6,79	0,03	0,54
SG	8,10	8,11	8,13	8,11	0,02	0,65
RR	1,86	1,87	1,88	1,87	0,01	0,06
MT	4,25	4,25	4,26	4,25	0,01	0,13

Dle výsledků stanovení technikou HPLC s RID detekcí u bílých vín (Tab. 8) je patrné, že vzorky měly různý obsah zbytkových cukrů. Byly zde zastoupeny kategorie suchých, polosuchých a polosladkých vín.

Nejvyšší obsah cukrů byl stanoven u vzorků vín Tramín červený ($42,71 \text{ g.l}^{-1}$) a Aurelius s obsahem cukrů $34,04 \text{ g.l}^{-1}$. Nejnižší obsah zbytkového cukru byl stanoven u vína Děvín ($1,30 \text{ g.l}^{-1}$) a Ryzlink rýnský ($1,87 \text{ g.l}^{-1}$). Směrodatné odchylky vykazují nízký rozptyl od průměrných hodnot. Opakovatelnost u metody HPLC s RID detekcí je dobrá. Metoda HPLC je přesná pro vzorky s nižším i vyšším obsahem zbytkového cukru.

Tab. 9 Výsledky HPLC stanovení celkových cukrů u červených vín

Vzorek	1. měření	2. měření	3. měření	Průměr (g.l^{-1})	S	r
	$\sum \text{Glu} + \text{Fru}$ (g.l^{-1})	$\sum \text{Glu} + \text{Fru}$ (g.l^{-1})	$\sum \text{Glu} + \text{Fru}$ (g.l^{-1})			
MP	0,66	0,68	0,68	0,67	0,01	0,02
FR	0,37	0,37	0,37	0,37	0	0,01
CUVČ	0,55	0,55	0,57	0,56	0,01	0,02
RM	0,58	0,59	0,57	0,58	0,01	0,02
CS	0,41	0,40	0,42	0,41	0,01	0,01
ZW	2,05	2,07	2,05	2,06	0,01	0,06

Z celkového počtu 15 analyzovaných vzorků, bylo 6 vzorků vín červených (Tab. 9). Všechna tato vína byla zařazena do kategorie suchých vín.

Nejvyšší obsah zbytkových cukrů byl stanoven u vzorku Zweigeltrebe $2,06 \text{ g.l}^{-1}$, naopak nejnižší obsah u vzorku Frankovka ($0,37 \text{ g.l}^{-1}$) a Cabernet Sauvignon ($0,41 \text{ g.l}^{-1}$).

Směrodatné odchylky vykazují nízký rozptyl od průměrných hodnot, stejně jako u vín bílých. Pohybují se v rozmezí od 0 do 0,01. Opakovatelnost metody HPLC s RID detekcí je dobrá.

8.2 Enzymatické stanovení glukózy a fruktózy

Vzorky vín (Tab.3) byly analyzovány enzymaticky třikrát. Dle postupu uvedeného v kapitole 7.2. se po změření všech absorbancí získané hodnoty dosadily do příslušných vzorců a po vynásobení faktorem ředění byl stanoven obsah glukózy a fruktózy v g.l^{-1} .

Tab. 10 Výsledky enzymatického stanovení glukózy a fruktózy u bílých vín

Vzorek	1. měření		2. měření		3. měření		Průměr Glu (g.l ⁻¹)	S Glu	Průměr	
	Glu (g.l ⁻¹)	Fru (g.l ⁻¹)	Glu (g.l ⁻¹)	Fru (g.l ⁻¹)	Glu (g.l ⁻¹)	Fru (g.l ⁻¹)			Fru (g.l ⁻¹)	S Fru
AUR	2,26	34,60	2,05	31,32	2,19	33,99	2,17	0,11	33,30	1,74
DĚV	0,38	0,90	0,39	0,88	0,38	0,89	0,38	0,01	0,89	0,01
MM	2,12	11,04	2,24	12,41	2,14	10,88	2,17	0,06	11,44	0,84
TČ	15,06	33,53	17,01	35,19	15,84	33,17	15,97	0,98	33,96	1,08
RB	0,33	19,54	0,34	18,13	0,36	17,27	0,34	0,02	18,32	1,15
CHAR	0,24	5,35	0,24	5,30	0,25	5,29	0,24	0,01	5,32	0,03
SG	1,19	10,64	1,38	8,30	1,40	10,24	1,32	0,12	9,73	1,25
RR	0,45	1,67	0,46	1,64	0,44	1,60	0,45	0,01	1,64	0,04
MT	0,72	4,21	0,74	4,13	0,71	4,20	0,72	0,02	4,18	0,04

Dle výsledků enzymatického stanovení obsahu jednotlivých sacharidů (Tab. 10) u bílých vín převládá ve všech 9 vzorcích fruktóza nad glukózou. Nejvyšší obsah fruktózy byl stanoven u vzorků Tramín červený (33,96 g.l⁻¹) a Aurelius (33,30 g.l⁻¹), nejnižší obsah fruktózy u vzorku Děvín (0,89 g.l⁻¹) a Ryzlink rýnský (1,64 g.l⁻¹). Nejvyšší obsah glukózy byl stanoven také u vzorků Tramín červený (15,97 g.l⁻¹) a Aurelius (2,17 g.l⁻¹), nejnižší obsah glukózy u vzorků Chardonnay (0,24 g.l⁻¹) a Rulandské bílé (0,34 g.l⁻¹).

Směrodatné odchylky u vzorků kategorie vín polosuchých a polosladkých vykazují větší rozptyl od průměrných hodnot než u techniky HPLC s RID detekcí - od 0,11 do 1,74. U vzorků s nižším obsahem cukrů jsou výsledky enzymatického stanovení srovnatelné s výsledky techniky HPLC.

Tab. 11 Výsledky enzymatického stanovení glukózy a fruktózy u červených vín

Vzorek	1. měření		2. měření		3. měření		Průměr Glu (g.l ⁻¹)	S Glu	Průměr	
	Glu (g.l ⁻¹)	Fru (g.l ⁻¹)	Glu (g.l ⁻¹)	Fru (g.l ⁻¹)	Glu (g.l ⁻¹)	Fru (g.l ⁻¹)			Fru (g.l ⁻¹)	S Fru
MP	0,28	0,39	0,27	0,40	0,28	0,41	0,28	0,01	0,40	0,01
FR	0,32	0,06	0,31	0,08	0,32	0,07	0,32	0,01	0,07	0,01
CUVČ	0,59	0,23	0,59	0,23	0,60	0,23	0,59	0,01	0,23	0
RM	0,41	0,40	0,42	0,39	0,41	0,41	0,41	0,01	0,40	0,01
CS	0,17	0,13	0,17	0,13	0,17	0,13	0,17	0	0,13	0
ZW	0,37	1,80	0,36	1,77	0,36	1,76	0,36	0,01	1,78	0,02

U vzorků červených vín (Tab. 11) převládá v obsahu zbytkového cukru fruktóza u Modrého Portugalu a Zweigeltrebe. U ostatních vzorků převládá glukóza.

Nejvyšší obsah fruktózy byl enzymatickou metodou stanoven u vín Zweigeltrebe ($1,78 \text{ g.l}^{-1}$), Modrý Portugal ($0,40 \text{ g.l}^{-1}$) a Rulandské modré ($0,40 \text{ g.l}^{-1}$), nejnižší obsah byl stanoven u vzorků Frankovka ($0,07 \text{ g.l}^{-1}$) a Cabernet Sauvignon ($0,13 \text{ g.l}^{-1}$).

U vzorků vín Cuvée červené ($0,59 \text{ g.l}^{-1}$) a Rulandské modré ($0,41 \text{ g.l}^{-1}$) byl enzymatickou metodou stanoven nejvyšší obsah glukózy. Nejnižší obsah glukózy byl stanoven u vín Cabernet Sauvignon ($0,17 \text{ g.l}^{-1}$) a Modrý Portugal ($0,28 \text{ g.l}^{-1}$) stejně jako u techniky HPLC.

Směrodatné odchylky u enzymatického stanovení vykazují rozptyl od 0,00 do 0,02 od průměrných hodnot. Enzymatická metoda je tedy vhodná pro stanovení vzorků s nízkým obsahem cukrů.

Tab. 12 Výsledky enzymatického stanovení celkových cukrů u bílých vín

Vzorek	1. měření $\sum \text{Glu} + \text{Fru}$ (g.l^{-1})	2. měření $\sum \text{Glu} + \text{Fru}$ (g.l^{-1})	3. měření $\sum \text{Glu} + \text{Fru}$ (g.l^{-1})	Průměr (g.l^{-1})	S	r
AUR	36,86	33,37	36,18	35,47	1,85	1,99
DĚV	1,28	1,27	1,27	1,27	0,01	0,07
MM	13,16	14,65	13,02	13,61	0,90	0,76
TČ	48,59	52,20	49,01	49,93	1,97	2,80
RB	19,87	18,47	17,63	18,66	1,13	1,04
CHAR	5,59	5,54	5,54	5,56	0,03	0,31
SG	11,83	9,68	11,63	11,05	1,19	0,62
RR	2,12	2,10	2,04	2,09	0,04	0,12
MT	4,93	4,87	4,91	4,90	0,03	0,27

U enzymatického stanovení (Tab. 12) vzorků bílých vín byl nejvyšší obsah zbytkového cukru stanoven také u vzorku Tramín červený ($49,93 \text{ g.l}^{-1}$). U tohoto vzorku došlo k největšímu rozdílu měření oproti technice HPLC ($42,71 \text{ g.l}^{-1}$), rozdíl činil $7,22 \text{ g.l}^{-1}$.

I další vzorky spadající do kategorie polosuchých a polosladkých vín vykazovaly rozdíly v měření mezi oběma metodami. K druhému největšímu rozdílu měření mezi oběma metodami došlo u vzorku Rulandské bílé (rozdíl $3,86 \text{ g.l}^{-1}$), následoval vzorek vína Sauvignon (rozdíl $2,93 \text{ g.l}^{-1}$), Muškát moravský (rozdíl $2,53 \text{ g.l}^{-1}$) a Aurelius (rozdíl $1,43 \text{ g.l}^{-1}$).

Směrodatné odchylky u těchto vín vykazují rozptyl od 1,13 do 1,97. U vín s nižším obsahem zbytkového cukru - Děvín, Ryzlink rýnský, Müller Thurgau jsou výsledky obou stanovení srovnatelné.

Tab. 13 Výsledky enzymatického stanovení celkových cukrů u červených vín

Vzorek	1. měření $\sum \text{Glu} + \text{Fru}$ (g.l ⁻¹)	2. měření $\sum \text{Glu} + \text{Fru}$ (g.l ⁻¹)	3. měření $\sum \text{Glu} + \text{Fru}$ (g.l ⁻¹)	Průměr (g.l ⁻¹)	S	r
MP	0,67	0,67	0,69	0,68	0,01	0,04
FR	0,38	0,39	0,39	0,39	0,01	0,02
CUVČ	0,82	0,82	0,83	0,82	0,01	0,05
RM	0,81	0,81	0,82	0,81	0,01	0,05
CS	0,30	0,30	0,30	0,30	0	0,02
ZW	2,17	2,13	2,12	2,14	0,03	0,12

U červených vín (Tab. 13), které byly zařazeny do kategorie suchých vín, jsou rozdíly u výsledků stanovení oproti technice HPLC jen nepatrné. Směrodatné odchylky vykazují nízký rozptyl od průměrných hodnot. Opakovatelnost metody je dobrá.

Z výsledků je patrné, že enzymatické stanovení je vhodné pro vzorky vín s nižším obsahem sacharidů.

8.3 Srovnání výsledků stanovení glukózy a fruktózy metodou HPLC-RID a enzymaticky

Dle kategorizace tichých vín podle obsahu zbytkového cukru dle Nařízení komise (ES) č. 607/2009, kterým se stanoví některá prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 479/2008, pokud jde o chráněná označení původu a zeměpisná označení, tradiční výrazy, označování a obchodní úpravu některých vinařských produktů jsou výrobci a distributoři tichých vín povinni na etiketě deklarovat kategorii vín dle obsahu zbytkového cukru [57]. Na základě tohoto nařízení byla vína dle naměřených hodnot rozdělena do jednotlivých skupin, na suchá, polosuchá, a polosladká vína.

- **Suché víno** - víno, které prokvasilo na nízký obsah zbytkového cukru, který smí obsahovat maximálně 4 g.l⁻¹ zbytkového cukru na litr nebo max. 9 g.l⁻¹ cukru v lit-

ru, pokud rozdíl zbytkového cukru a celkového obsahu kyselin přepočtený na kyselinu vinnou je 2 g nebo méně.

- **Polosuché víno** - vína se zbytkovým cukrem, který je větší než nejvyšší hodnota stanovená pro vína suchá, ale nepřesahuje 12 g.l⁻¹.
- **Polosladké víno** - obsah zbytkového cukru ve víně je větší než nejvyšší hodnota stanovená pro vína polosuchá, ale dosahuje nejvýše 45 g.l⁻¹.
- **Sladké víno** - víno s vyšším obsahem zbytkového neprokvašeného cukru a to jak sensoricky tak analyticky. Zpravidla se jedná o vína speciální, určená pro dlouhé zrání. Obsah alkoholu je u našich tichých sladkých vín nižší (7-11 %). Dle legislativních předpisů se jedná o víno se zbytkovým cukrem ve výši nejméně 45 g.l⁻¹ [42].

8.3.1 Suchá vína

V kategorii suchých vín bylo analyzováno celkem 8 vzorků vín, kde pouze dva vzorky, a to Děvín a Ryzlink rýnský byla vína bílá, zbytek vzorků tvořila vína červená (Tab. 14). Z celkového množství 15 vzorků byla všechna červená vína zařazena do kategorie vín suchých.

Tab. 14 Suchá vína

Víno	Enzymatické stanovení				HPLC stanovení			
	Glu (g.l ⁻¹)	Fru (g.l ⁻¹)	Σ Glu, Fru (g.l ⁻¹)	Poměr Glu : Fru	Glu (g.l ⁻¹)	Fru (g.l ⁻¹)	Σ Glu, Fru (g.l ⁻¹)	Poměr Glu : Fru
DĚV	0,38	0,89	1,27	1 : 2,34	0,33	0,97	1,30	1 : 2,94
RR	0,45	1,64	2,09	1 : 3,64	0,26	1,61	1,87	1 : 6,20
MP	0,28	0,40	0,68	1 : 1,43	0,27	0,40	0,67	1 : 1,48
FR	0,32	0,07	0,39	1 : 0,22	0,33	0,04	0,37	1 : 0,12
CUVČ	0,59	0,23	0,82	1 : 0,39	0,51	0,05	0,56	1 : 0,10
RM	0,41	0,40	0,81	1 : 0,98	0,42	0,16	0,58	1 : 0,98
CS	0,17	0,13	0,30	1 : 0,76	0,15	0,26	0,41	1 : 1,73
ZW	0,36	1,78	2,14	1 : 4,94	0,28	1,78	2,06	1 : 6,36

Největší obsah zbytkového cukru byl stanoven u bílých vín ve vzorku Ryzlink rýnský, kde celkový obsah činil 2,09 g.l⁻¹ u enzymatického stanovení a 1,87 g.l⁻¹ u techniky HPLC, u

červených vín to byl vzorek Zweigeltrebe s obsahem zbytkového cukru $2,14 \text{ g.l}^{-1}$ u enzymatické metody a $2,06 \text{ g.l}^{-1}$ technikou HPLC.

Nejnižší obsah zbytkového cukru byl enzymatickým stanovením naměřen u vzorku Cabernet Sauvignon $0,30 \text{ g.l}^{-1}$ (HPLC technikou $0,41 \text{ g.l}^{-1}$), kdy technikou HPLC byl naměřen nejnižší obsah u vzorku Frankovka - $0,37 \text{ g.l}^{-1}$ (enzymaticky $0,41 \text{ g.l}^{-1}$).

U vzorků Děvín, Modrý Portugal, Frankovka, Cabernet Sauvignon a Zweigeltrebe jsou rozdíly v měření obsahu zbytkových cukrů mezi metodami (od $0,01$ do $0,11 \text{ g.l}^{-1}$) jen nepatrné (Obr. 7), i když u techniky HPLC s RID detekcí je laboratoří dle OIV ve vyhodnocení kalibrační závislosti definována mez stanovení $0,5 \text{ g.l}^{-1}$.

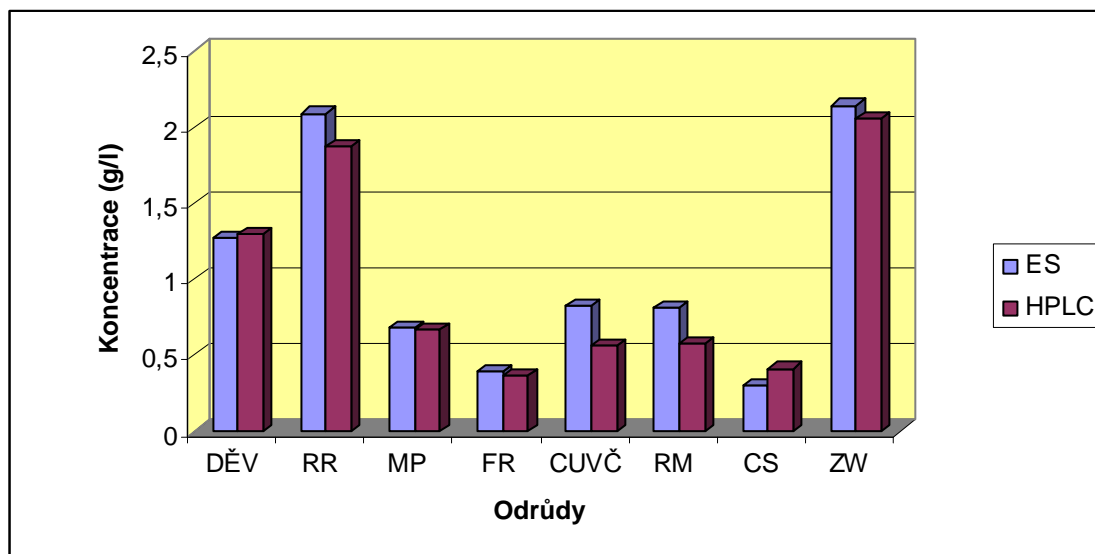
Také dle výsledků opakovatelnosti vyjadřující těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek a dle nízkých směrodatných odchylek, které značí malý rozptyl od průměrných hodnot je metoda HPLC s RID detekcí vhodnější.

U vzorků Ryzlink rýnský, Cuvée červené a Rulandské modré byly rozdíly od $0,22$ do $0,26 \text{ g.l}^{-1}$ vyšší (Obr. 7), bez vlivu na změnu zařazení do jiné kategorie.

Poměr glukózy a fruktózy se v jednotlivých vzorcích značně liší. U vzorku Děvín, Ryzlink rýnský, Modrý Portugal, Cabernet Sauvignon a Zweigeltrebe převládá fruktóza nad glukózou, kdy největší poměr Glu : Fru je u odrůdy Zweigeltrebe a to $1 : 6,36$, naopak nejmenší poměr je u Modrého Portugalu a to $1 : 1,48$.

U vzorků Frankovka a Cuvée červené značně převládá glukóza, což je neobvyklé vzhledem k faktu, že fruktóza se stává v průběhu alkoholového kvašení zdrojem pro kvasinky teprve po vyčerpání glukózy, hlavního substrátu. Tato situace nastala pouze u měření suchých vín, což lze zdůvodnit celkovým nízkým obsahem zbytkového cukru. Dalším možným vysvětlením je, že byly při kvašení moštů těchto odrůd použity fruktofilní kvasinky.

U jediného vzorku, a to u vzorku vína Rulandské modré byl poměr glukózy a fruktózy téměř vyrovnaný, kdy poměr Glu : Fru byl $1 : 0,98$. Poměr Glu : Fru se u hotového vína značně liší oproti poměru Glu : Fru v moštích, kdy je tento poměr obecně vyrovnaný stejně jako u zralých hroznů.



Obr. 7 Obsah glukózy a fruktózy u suchých vín

8.3.2 Polosuchá vína

V kategorii polosuchých vín byly analyzovány čtyři vzorky (Tab. 15). Všechny čtyři vzorky byla vína bílá. V této kategorii již došlo k větším rozdílům měření mezi oběma metodami, taktéž však rozdíly nemají vliv na zařazení do kategorie dle obsahu zbytkového cukru.

Tab. 15 Polosuchá vína

Víno	Enzymatické stanovení				HPLC stanovení			
	Glu (g.l ⁻¹)	Fru (g.l ⁻¹)	Σ Glu, Fru (g.l ⁻¹)	Poměr Glu : Fru	Glu (g.l ⁻¹)	Fru (g.l ⁻¹)	Σ Glu, Fru (g.l ⁻¹)	Poměr Glu : Fru
MM	2,17	11,44	13,61	1 : 5,27	1,07	10,01	11,08	1 : 9,36
CHAR	0,24	5,32	5,56	1 : 22,17	0,62	6,17	6,79	1 : 9,95
SG	1,32	9,73	11,05	1 : 7,37	0,31	7,80	8,11	1 : 25,16
MT	0,72	4,18	4,90	1 : 5,81	0,37	3,88	4,25	1 : 10,49

Z Tabulky 15 vyplývá, že nejvyšší obsah zbytkového cukru měl vzorek Muškát moravský, kde byl enzymatickým stanovením naměřen obsah zbytkového cukru 13,61 g.l⁻¹, technikou HPLC 11,08 g.l⁻¹. Naopak nejnižší obsah byl zjištěn u vzorku Müller Thurgau, a to 4,90 g.l⁻¹ enzymatickou metodou a 4,25 g.l⁻¹ technikou HPLC.

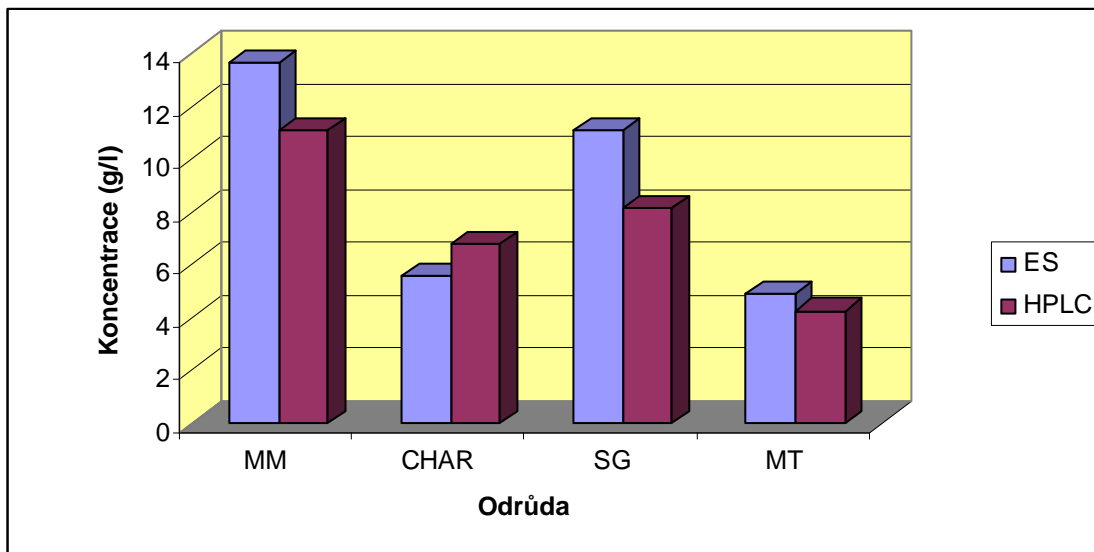
U vín Müller Thurgau a Chardonnay byl rozdíl mezi měřením obsahu glukózy a fruktózy ($0,65 \text{ g.l}^{-1}$ a $1,23 \text{ g.l}^{-1}$) poměrně malý, opakovatelnost i rozptyl směrodatné odchylky u obou metod je dobrý, stejně jako u kategorie suchých vín, je HPLC metodou přesnější.

U vzorku Muškát Moravský byl rozdíl mezi výsledky měření oběma metodami již větší, a to $2,53 \text{ g.l}^{-1}$, kdy opakovatelnost u enzymatického stanovení je 0,76 a směrodatná odchylka 0,90, u HPLC opakovatelnost 0,09, směrodatná odchylka 0,03. Kolísavý výsledek u třech enzymatických stanovení MM mohl být způsoben ředěním vzorků (faktor ředění 100).

U vína Sauvignon byl rozdíl v měření mezi oběma metodami nejvyšší a činil $2,96 \text{ g.l}^{-1}$. Opakovatelnost i směrodatná odchylka u HPLC techniky je dobrá, u enzymatického stanovení je však opakovatelnost 0,62 a rozptyl směrodatné odchylky 1,19. U stanovení tohoto vzorku byl rovněž použit faktor ředění 100. Se zvyšujícím se obsahem cukrů ve vzorcích je enzymatické stanovení méně přesné oproti technice HPLC. Je to patrně dáno ředěním vzorků při jejich přípravě pro enzymatické stanovení.

S vyšším obsahem cukrů se také zvyšoval rozdíl mezi poměrem glukózy a fruktózy v jednotlivých vínech i rozdíl mezi oběma metodami měření. Nejnižší poměr 1 : 5,27 byl zjištěn u vzorku Muškát moravský u enzymatického stanovení, u HPLC byl nejnižší poměr také u vzorku Muškát moravský, avšak tento poměr byl 1 : 9,36. Nejvyšší poměr byl enzymatickým stanovením zjištěn u vzorku Chardonnay - 1 : 22,7, u techniky HPLC je to 1 : 25,16 u vzorku Sauvignon.

Se zvyšujícím se obsahem zbytkového cukru došlo nejen k větším rozdílům mezi měřením celkových cukrů, ale i mezi měřením jednotlivých monosacharidů. Rozdíly mezi měřením glukózy i fruktózy byly patrné u všech čtyř vzorků (Obr. 8).



Obr. 8 Obsah glukózy a fruktózy u polosuchých vín

8.3.3 Polosladká vína

Ve třetí kategorii u polosladkých vín byly analyzovány tři vzorky (Tab.16, Obr. 9). Všechny tři vzorky patřily mezi vína bílá.

Tab. 16 Polosladká vína

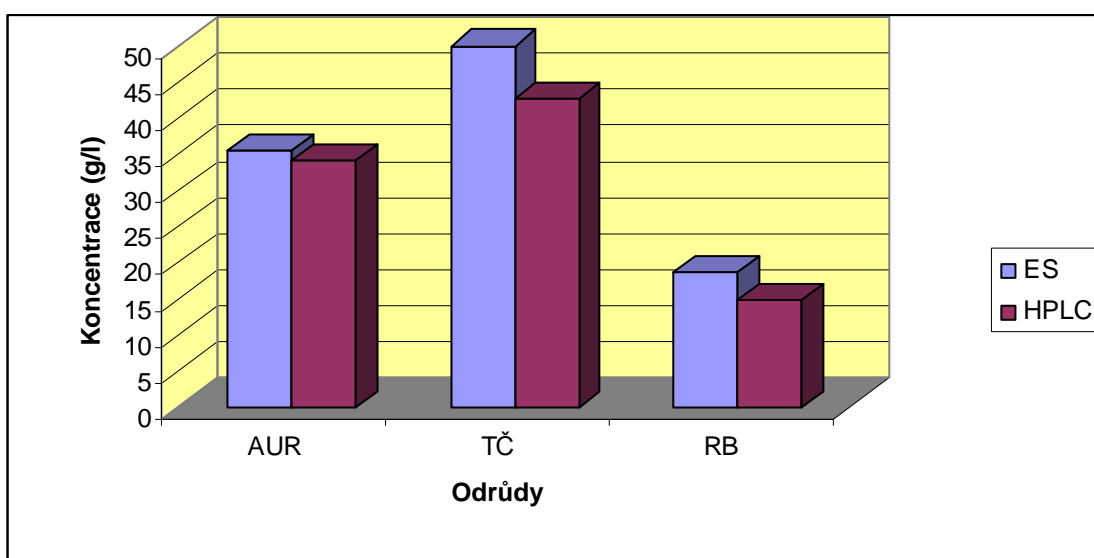
Víno	Enzymatické stanovení				HPLC stanovení			
	Glu (g.l ⁻¹)	Fru (g.l ⁻¹)	Σ Glu, Fru (g.l ⁻¹)	Poměr Glu : Fru	Glu (g.l ⁻¹)	Fru (g.l ⁻¹)	Σ Glu, Fru (g.l ⁻¹)	Poměr Glu : Fru
AUR	2,17	33,30	35,47	1 : 15,35	1,99	32,05	34,04	1 : 16,11
TČ	15,97	33,96	49,93	1 : 2,13	5,56	37,15	42,71	1 : 6,68
RB	0,34	18,32	18,66	1 : 53,88	0,65	14,15	14,80	1 : 21,77

Nejmenší rozdíl obsahu cukrů mezi jednotlivými metodami vyšel u vzorku Aurelius, kdy při enzymatickém stanovení byl obsah glukózy a fruktózy 35,47 g.l⁻¹ a u HPLC techniky 34,04 g.l⁻¹. Rozdíl v měření tedy činil 1,43 g.l⁻¹. Směrodatná odchylka u enzymatického stanovení činila 1,85, u HPLC techniky jen 0,01. Koeficient opakovatelnosti byl vzhledem k vyššímu obsahu cukrů celkově vyšší.

U Rulandského bílého činil rozdíl v měření $3,89 \text{ g.l}^{-1}$, přičemž směrodatná odchylka pro enzymatické stanovení činila 1,13, pro HPLC 0,03. U obou vín výsledky měření spadají do kategorie vín polosladkých.

U třetího vzorku Tramínu červeného, který měl ze všech vzorků nejvyšší obsah cukrů, došlo k situaci, kdy dle techniky HPLC bylo víno zařazeno do kategorie polosladkých vín s obsahem zbytkových cukrů $42,71 \text{ g.l}^{-1}$, avšak dle enzymatického stanovení při obsahu zbytkových cukrů $49,93 \text{ g.l}^{-1}$ patřilo víno do kategorie vín již sladkých. Rozdíl byl patrně způsoben ředěním vzorku při přípravě na enzymatickou analýzu, kdy byl použit faktor ředění 100.

Poměry mezi Glu : Fru kolísaly mezi jednotlivými metodami stejně jako u vín polosuchých. Srovnatelně vyšel poměr pouze u odrůdy Aurelius, který byl u enzymatického stanovení 1 : 15,35 a u techniky HPLC 1 : 16,11. U dalších dvou vzorků se poměry Glu : Fru dost lišily.



Obr. 9 Obsah glukózy a fruktózy u polosladkých vín

ZÁVĚR

Víno je plným právem považováno za zdravý a hygienický nápoj, svým charakterem a použitím se řadí mezi pochutiny, obsahuje však i velké množství látek nezbytných pro výživu člověka. Kromě základních složek - vody, etanolu, cukru, kyselin, polyfenolických látek aj. obsahuje i řadu mikroelementů např. měď, železo, kobalt, mangan a další prvky, které působí v lidském těle jako biokatalyzátory, aktivující biochemické procesy. Bylo prokázáno, že víno napomáhá prevenci cévních a srdečních onemocnění, zlepšuje trávení, má antibakteriální účinky a obsahuje protirakovinné látky.

Sacharidy jsou podstatnou součástí vína a také jeho základním ukazatelem kvality. Během procesu fermentace jsou to právě sacharidy, jež jsou kvasinkami transformovány na etanol.

V experimentální části diplomové práce byl stanoven obsah glukózy a fruktózy, technikou HPLC s RID detekcí a enzymatickou metodou, u 15 vzorků červených a bílých vín. Devět vzorků vín - Aurelius, Děvín, Muškát moravský, Tramín červený, Rulandské bílé, Chardonnay, Sauvignon, Ryzlink rýnský a Müller Thurgau patří mezi vína bílá; a šest vzorků - Modrý Portugal, Frankovka, Cuvée červené, Rulandské modré, Cabernet Sauvignon a Zweigeltrebe jsou červená vína.

U HPLC s RID detekcí se glukóza a fruktóza separovaly na křemenné koloně s vázaným alkylaminem a v mobilní fázi směsi acetonitrilu a vody. Jednotlivé složky se detekovaly pomocí refraktometrického detektoru. Enzymatické stanovení bylo provedeno pomocí hexokinázové metody, při které se ke stanovení glukózy používá směs enzymů hexokinázy a glukózo-6-fosfát dehydrogenázy a ke stanovení fruktózy enzymy fosfoglukózoizomerázy. Jednotlivé absorbance byly stanoveny spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm. Po změření všech absorbancí se získané hodnoty dosadily do příslušných vzorců a po vynásobení faktorem ředění byl stanoven obsah glukózy a fruktózy v g.l^{-1} .

Dle výsledků analýzy byl stanoven nejvyšší obsah glukózy u bílých vín ve vzorku Tramín červený ($5,56 \text{ g.l}^{-1}$) a Aurelius ($1,99 \text{ g.l}^{-1}$), nejnižší obsah glukózy u vzorku Ryzlink rýnský ($0,26 \text{ g.l}^{-1}$) a Sauvignon ($0,31 \text{ g.l}^{-1}$). Nejvyšší obsah fruktózy ve vzorcích bílých vín byl stanoven také u vzorku Tramín červený ($37,15 \text{ g.l}^{-1}$) a Aurelius ($32,05 \text{ g.l}^{-1}$). Nejnižší obsah fruktózy byl stanoven u vzorku Děvín ($0,97 \text{ g.l}^{-1}$) a Ryzlink rýnský ($1,61 \text{ g.l}^{-1}$).

U vzorků červených vín byl nejvyšší obsah glukózy stanoven u vzorku Cuvée červené ($0,51 \text{ g.l}^{-1}$) a Rulandské modré ($0,42 \text{ g.l}^{-1}$), nejnižší obsah glukózy u vzorku Cabernet Sau-

vignon ($0,15 \text{ g.l}^{-1}$) a Modrý Portugal ($0,27 \text{ g.l}^{-1}$). Nejvíce fruktózy obsahoval z červených vín vzorek Zweigeltrebe ($1,78 \text{ g.l}^{-1}$) a Modrý Portugal ($0,40 \text{ g.l}^{-1}$), naopak nejnižší obsah fruktózy byl stanoven u vzorku Frankovka ($0,04 \text{ g.l}^{-1}$) a Cuvée červené ($0,05 \text{ g.l}^{-1}$).

Dle obsahu celkových cukrů (glukóza a fruktóza) byla vína rozdělena do 3 kategorií: vína suchá, polosuchá a polosladká. K vínům polosuchým byly zařazeny vína: Muškát moravský, Chardonnay, Sauvignon a Müller Thurgau. Jako vína polosladká byly určeny vína: Aurelius, Tramín červený a Rulandské bílé; a suchá: Děvín, Ryzlink rýnský, Modrý Portugal, Frankovka, Cuvée červené, Rulandské modré, Cabernet Sauvignon a Zweigeltrebe. U žádného vzorku nebyla technikou HPLC/RID zjištěna hodnota zbytkového cukru nad 45 g.l^{-1} , která by ho kategorizovala do skupiny sladkých vín. Na základě výsledků z enzymatického stanovení jeden vzorek vína (Tramín červený - $49,93 \text{ g.l}^{-1}$) už byl zařazen do kategorie vín sladkých. Z výsledků u enzymatického stanovení ale vyplynulo, že celkově se zvyšujícím se obsahem cukrů docházelo postupně k větším rozdílům měření mezi oběma metodami. Tato situace mohla nastat z důvodu ředění vzorků pro enzymatické stanovení.

Z těchto výsledků vyplývá, že vysokouúčinná kapalinová chromatografie je metodou přesnější, tedy i vhodnější ke stanovení hlavních sacharidů ve víně. Opakovatelnost metody je dobrá, směrodatné odchylky vykazují nízký rozptyl od průměrných hodnot.

Metoda enzymatického stanovení je rychlá, provozní metoda, která ale není vhodná pro stanovení sacharidů ve vínech s vyšším obsahem cukrů, kdy již musí být použito ředění.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PAVLOUŠEK, Pavel. *Vinohradnictví: odrůdy révy vinné*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1999. 122 s. ISBN 80-715-7415-5.
- [2] ROP, Otakar, HRABĚ, Jan. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*. Zlín: UTB, 2009. 129 s. ISBN 978-80-7318-748-4.
- [3] STEIDL, Robert. *Sklepní hospodářství*. V českém jazyce vyd. 2., aktualiz. Překlad Jiří Sedlo. Valtice: Národní vinařské centrum, 2010, 309 s. ISBN 978-80-903201-9-2.
- [4] OTÁHAL, Karel. *Jak z hroznů víno dělat*. Praha: Jonathan Livingston, 2010, 99 s. ISBN 978-80-86037-35-6.
- [5] KRAUS, Vilém, HUBÁČEK, Vítězslav, a ACKERMANN, Petr. *Rukověť vinaře*. 3. vyd. Praha: Brázda, 2010. 267 s. ISBN 978-80-209-0378-5.
- [6] RIBÉREAU-GAYON, Pascal, DUBOURDIEU, Denis, DONÉCHE, Bernard. *Handbook of enology*. 2nd ed. Hoboken, NJ, 2006. ISBN 04-700-1037-1.
- [7] KADLEC, Pavel., MELZOCH, Karel, VOLDŘICH, Michal. a kolektiv. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?* Key Publishing s.r.o., Ostrava 2009. ISBN 978-80-7418-051-4.
- [8] PÁTEK, Jaroslav. *Zrození vína*. 2. rozš. vyd. Brno: Jota, 2000, 293 s. ISBN 80-721-7101-1.
- [9] RANKINE, Bryce. *Making good wine*. Australia: Macmillan edition, 2004. 318 s. ISBN 1-4050-3601
- [10] KRAUS, Vilém, KUTTELVAŠER, Zdeněk, VURM, Bohumil. *Encyklopedie českého a moravského vína*. Praha, 1997, 228 s. ISBN 80-7023-250-1.
- [11] KRAUS, Vilém, KOPEČEK, Jiří. *Setkání s vínem*. Praha, 2002. ISBN 80-86031-36-5
- [12] CALLEC, Christian. *Vína: encyklopedie*. 4. vyd. Čestlice: Rebo, 2005. 320 s. ISBN 978-80-7234-480-2.

- [13] FIALKOVÁ, Božena. *Enologie a odborná degustace*. Vyd. 3. Praha: Vysoká škola hotelová v Praze 8, 2007. 140 s. ISBN 978-80-86578-70-5.
- [14] KRAUS, Vilém. *Pěstujeme révu vinnou: odrůdy révy vinné*. 2., aktualiz. a rozš. vyd. Praha: Grada, 2012. 111 s. ISBN 978-80-247-3465-1.
- [15] MINÁRIK, Erich, NAVARA, A. *Chémia a mikrobiológia vína*. Bratislava, 1986.
- [16] STICK, Robert.V., WILLIAMS, Spencer. *Carbohydrates: The Essential Molecules of Life*. Second edition 2009. Academic Press, Oxford. ISBN 978-0-240-52118-3.
- [17] MUSIL, Stanislav, MENŠÍK, Josef. *Vinařství*. 3 vyd. Praha: SZN, 1970. 439 s.
- [18] STEVENSON, Tom. *Světová encyklopedie vína*. 3. přeprac.vyd. Praha: Knižní klub v edici Balios, 2001. 502 s. ISBN 80-242-0619-6.
- [19] JACKSON, Ronald, S. *Wine Science: Principles and Applications*. 3. Edition. Academic Press, Mar 2008, 751 s. ISBN 0123736463.
- [20] KRAUS, Vilém, FOFFOVÁ, Zuzana, VURM, Bohumil. *Encyklopedie českého a moravského vína*, 1. díl, Praha 2005. ISBN 80-86767-00-0.
- [21] ČOPÍKOVÁ, Jana. *Chemie a analytika sacharidů*, Vydavatelství VŠCHT, Praha 1997. ISBN 80-7080-306-1.
- [22] VELÍŠEK, Jan, HAJŠLOVÁ, Jana. *Chemie potravin 1*. 3 vyd. Tábor: OSSIS, 2009, ISBN 978-80-86659-15-2
- [23] BOCHKOV, A.F., ZAIKOV, G.E., AFANASIEV V.A. *Carbohydrates*, VSP BV, 1991. Utrecht. ISBN 90-6764-118-9.
- [24] GARRETT, Reginald, H., GRISHAM, Charles, M. *Biochemistry, Books/Cole*. Boston, 2010, 871 s. ISBN 13:978-0-495-10935-8
- [25] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-866-5903-8.
- [26] VOGEL, Wolfgang. *Víno z vlastního sklepa*. Vydavatelství VÍKEND, s.r.o., 2010.

- ISBN 978-80-7433-026-1.
- [27] Projekt OP RLZ Opatření 3.2-0309 CEPAC
- [28] JACKISCH, Philip, *Modern Winemaking*. Cornell University Press, 1985. 289 s.
ISBN 978-08-0141-455-8.
- [29] DOSTÁL, Jan a kolektiv. *Lékařská chemie*. Skripta. LF MU. Brno, 2005.
- [30] PAVLOUŠEK, Pavel. *Pěstování révy vinné*. Praha, 2011. 336s. ISBN 978-80-247-3314-2.
- [31] PRÍBELA, Alexander. *Analýza potravín*. Bratislava, 1991. ISBN 80-227-0374-5.
- [32] KOVÁČ, J. A KOL. *Spracovanie hrozna*. Bratislava, 1990. ISBN 80-07-00313-4.
- [33] ČERNÝ, Miloslav, TRNKA, Tomáš, BUDĚŠÍNSKÝ, Miloš. *Sacharidy*. Česká společnost chemická v edici Chemické listy. Praha, 2010. ISBN 978-80-86238-81-4.
- [34] FARKAŠ, Ján. *Technologie a biochemie vína*. 2. přeprac. a doplň. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1980. 870 s.
- [35] DEL ALAMO, M., et al. *Red wine aging in oak barrels: evolution of the monosaccharides content*. Food Chemistry. 2000. ISSN 0308-8146/00.
- [36] KOHOUT, František. *O víně*. 2. vyd. Praha: Merkur, 1986. 265 s.
- [37] KUTTELVAŠER, Zdeněk. *Abeceda vína*. Praha, 2003. ISBN 80-86031-43-8.
- [38] FORREST, Tom. *Všechno, co potřebujete vědět o víně*. Praha, 2004. 400 s. ISBN 80-736-0152-4.
- [39] DOHNAL Tomáš, KRAUS Vilém. *Pěstování révy a využití hroznů*. Státní zemědělské nakladatelství Praha, 1972. ISBN 07-043-72-04/43.
- [40] ŠEVČÍK, Libor. *Červená vína: hledání pravdy o víně*. 1. vyd. Praha: Grada, 1999, 139 s. ISBN 80-716-9840-7.
- [41] Projekt OP RLZ Opatření 3.3-0212 CEPAC
- [42] ZÁKON O VINOHRADNICTVÍ A VINAŘSTVÍ, 323/2004 Sb. Praha, Tiskárna

Ministerstva vnitra.

- [43] PAVLOUŠEK, Pavel. *Výroba vína u malovinařů. 2. aktualizované a rozšířené vydání.* Praha, 2010. 120 s. ISBN 978-80-247-3487-3.
- [44] VELÍŠEK, Jan, CEJPEK, Karel. *Biosynthesis of food components.* Tábor, 2008. 497 s. ISBN 978-80-86659-12-1.
- [45] DYR, Josef. *Kvasná chemie a technologie I.* SNTL/SVTL, Praha 1965.
- [46] ALMEIDA, C. M. R.; VASCONCELOS, M. T. S. D. *Multielement Composition of Wines and Their Precursors Including Provenance Soil and Their Potentialities As Fingerprints of Wine Origin.* Food Chem, 2003. 51 s. . ISSN 00218561.
- [47] KRAUS, Vilém, FOFFOVÁ, Zuzana, VURM, Bohumil. *Encyklopedie českého a moravského vína. 2. díl,* Praha, 2008. 311 s. ISBN 978-80-86767-09-3.
- [48] VARANDAS, S., et al. *Glucose and fructose levels on grape skin: interference in Lobesia botrana behaviour.* Analytica Chimica Acta, 2004. 513 s. ISSN 00032670.
- [49] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody. 2. upr. a dopl. vyd.* Ostrava, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [50] PERTILE, Eva, ČABLÍK, Vladimír. *Instrumentální metody analýzy* Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2006. 238 s. ISBN 80-248-1049-2.
- [51] FARKOVÁ, Marta. *Instrumentální analytická chemie - praktikum.* Brno: Masarykova univerzita, 2011. 167 s. ISBN 978-802-1055-346.
- [52] MEYER. *Journal of chromatography.* Amsterdam, 2005. ISBN 0021-9673.
- [53] VOLKA, Karel. *Analytická chemie II.* Praha 1: Nakladatelství technické literatury, 1995. 236 s. ISBN 80-7080-227-8.
- [54] CHURÁČEK, Jaroslav a kol. *Kapalinová chromatografie, Analytická separace látek.* Praha, SNTL, 1990. 384 s. ISBN 04-626-90.
- [55] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody.* Praha: Karolinum, 2004. 264 s. ISBN

80-246-0852-9.

- [56] AMERINE, Maynard, Andrew. *Methods for analysis of must and wines*. 2. vyd. University of California, Toronto, 1980. ISBN 0-471-05077-6.
- [57] *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*. Edition 2012 Volume 1, Paris: 2013, s 328-330. ISBN 979-10-91799-06-5.
- [58] BALÍK, Josef. *Vinařství návody do laboratorních cvičení*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2004. 98 s. ISBN 80-7157-809-6.
- [59] STEIDL, Robert, RENNER, Wolfgang. *Moderní příprava červeného vína*. 2. vyd. Valtice: Národní vinařské centrum, 2006. 72 s. ISBN 80-903-2017-1.
- [60] KURTZMAN, Jack. *The yeasts: a taxonomic study*. 4th ed. New York: Elsevier, 2000. ISBN 04-448-1312-8.
- [61] Projekt SIPVZ c.0636P2006 Bunka – interaktivní výuková aplikace
- [62] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie II*. VUTIUM Brno, 2000, ISBN 80-214-1742-0.
- [63] BERTHELS AT AL. *Discrepancy glucose and fructose utilisation during fermentation by Saccharomyces cerevisiae Wine yeast strains*. Department of Viticulture and Oenology, Stellenbosch, South Afrika. 2004.
- [64] MALÍK, Fedor. *Ze života vína*. Pardubice: Filip Trend, 2003, 221 s. ISBN 80-862-8227-9.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

°NM	stupně normalizovaného moštoměru
°ČNM	stupně československého normalizovaného moštoměru
°Kl	stupně Klosterneuburského moštoměru
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPAEC	vysokoučinná aniontově - výměnná chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
NIRS	spektroskopie v blízké infračervené oblasti
RID	refraktometrická detekce
AL	aromatické látky
Glu	Glukóza
Fru	Fruktóza
AUR	Aurelius
DĚV	Děvín
MM	Muškát moravský
TČ	Tramín červený
RB	Rulandské bílé
CHAR	Chardonnay
SG	Sauvignon
RR	Ryzlink rýnský
MT	Müller Thurgau
MP	Modrý Portugal
ZW	Zweigeltrebe
CUVČ	Cuvée červené
RM	Rulandské modré

CS Cabernet Sauvignon

FR Frankovka

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 Morfologie hroznu [43].....</i>	13
<i>Obr. 2 Poměr jednotlivých AL ve vlně [25].....</i>	28
<i>Obr. 3 Schéma výroby vína [7].....</i>	32
<i>Obr. 4 Schéma HPLC[54]</i>	40
<i>Obr. 5 Kalibrační křivka glukózy (g.l^{-1}).....</i>	53
<i>Obr. 6 Kalibrační křivka fruktózy (g.l^{-1}).....</i>	55
<i>Obr. 7 Obsah glukózy a fruktózy u suchých vín.....</i>	64
<i>Obr. 8 Obsah glukózy a fruktózy u polosuchých vín.....</i>	66
<i>Obr. 9 Obsah glukózy a fruktózy u polosladkých vín.....</i>	67

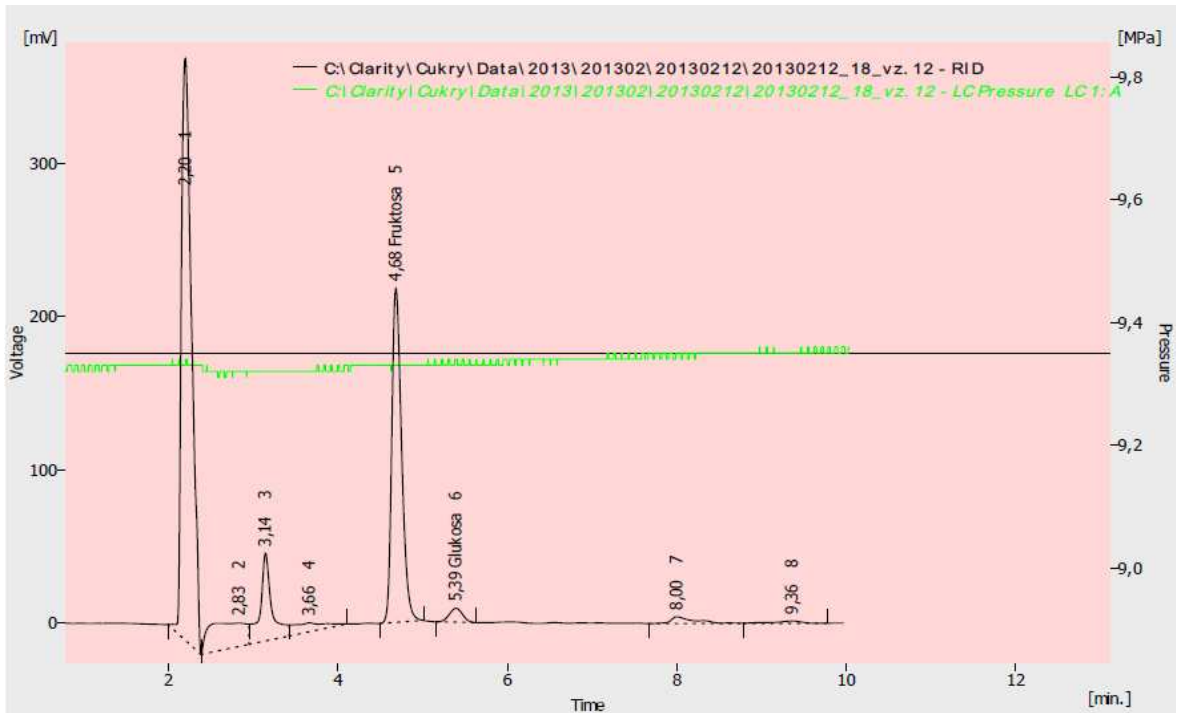
SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1 Obsah sacharidů ve vínech [25].....</i>	<i>25</i>
<i>Tab. 2 Změny složení minerálních látek a vitamínů před a po</i>	<i>30</i>
<i>Tab. 3 Analyzované vzorky vín.....</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 4 Závislost plochy píku na koncentraci glukózy</i>	<i>53</i>
<i>Tab. 5 Závislost plochy píku na koncentraci fruktózy</i>	<i>54</i>
<i>Tab. 6 Výsledky HPLC stanovení glukózy a fruktózy u bílých vín.....</i>	<i>56</i>
<i>Tab. 7 Výsledky HPLC stanovení glukózy a fruktózy u červených vín</i>	<i>57</i>
<i>Tab. 8 Výsledky HPLC stanovení celkových cukrů u bílých vín</i>	<i>57</i>
<i>Tab. 9 Výsledky HPLC stanovení celkových cukrů u červených vín.....</i>	<i>58</i>
<i>Tab. 10 Výsledky enzymatického stanovení glukózy a fruktózy u bílých vín.....</i>	<i>59</i>
<i>Tab. 11 Výsledky enzymatického stanovení glukózy a fruktózy u červených vín</i>	<i>59</i>
<i>Tab. 12 Výsledky enzymatického stanovení celkových cukrů u bílých vín.....</i>	<i>60</i>
<i>Tab. 13 Výsledky enzymatického stanovení celkových cukrů u červených vín</i>	<i>61</i>
<i>Tab. 14 Suchá vína.....</i>	<i>62</i>
<i>Tab. 15 Polosuchá vína</i>	<i>64</i>
<i>Tab. 16 Polosladká vína</i>	<i>66</i>

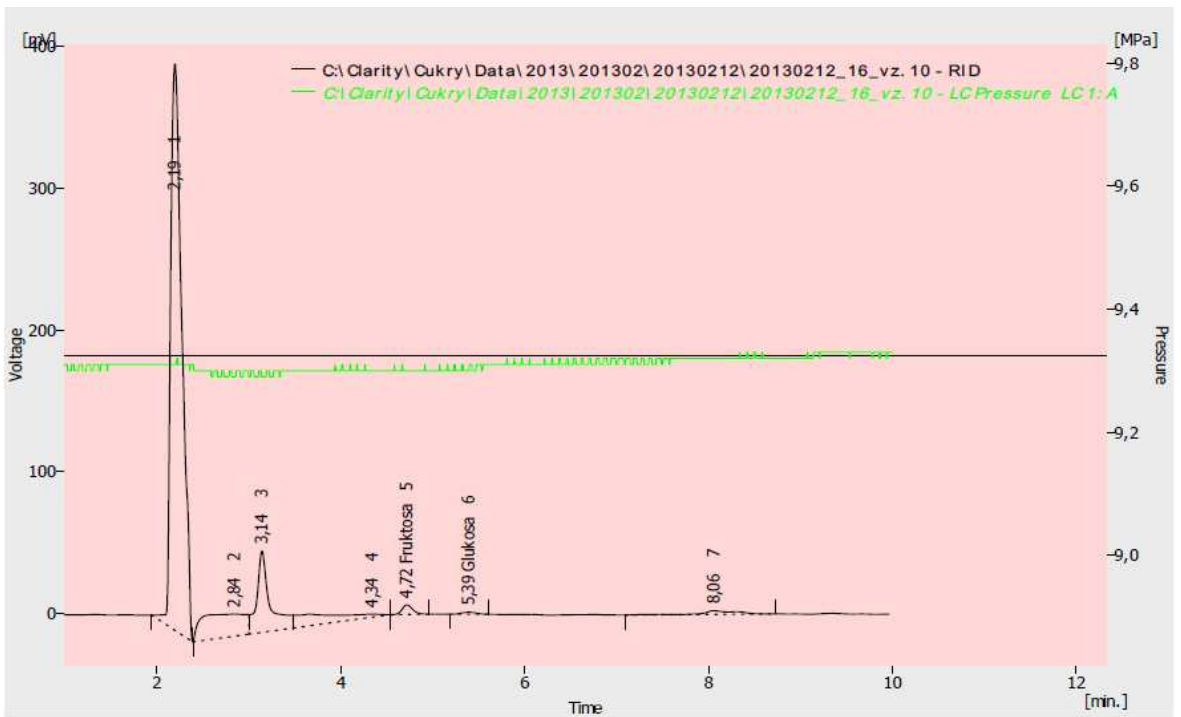
SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P 1 Chromatogramy analyzovaných vzorků (15 x)

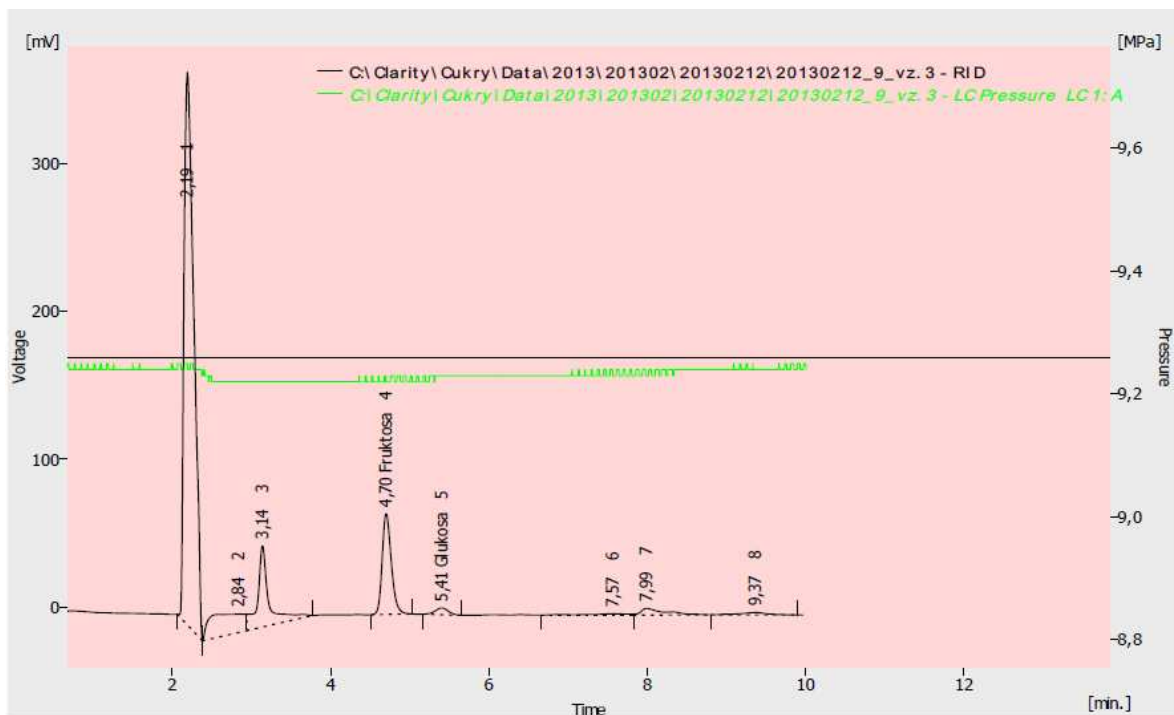
PŘÍLOHA P I: CHROMATOGRAMY STANOVOVANÝCH VZORKŮ



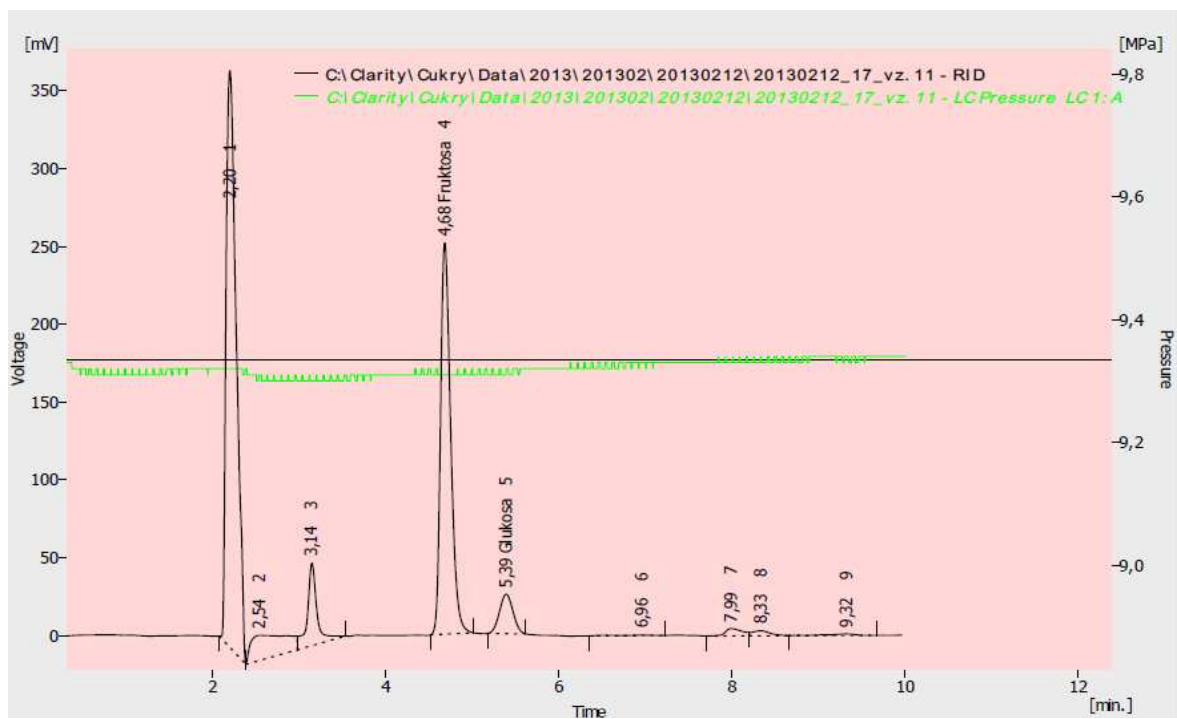
Chromatogram č. 1 - Aurelius, výběr z hroznů



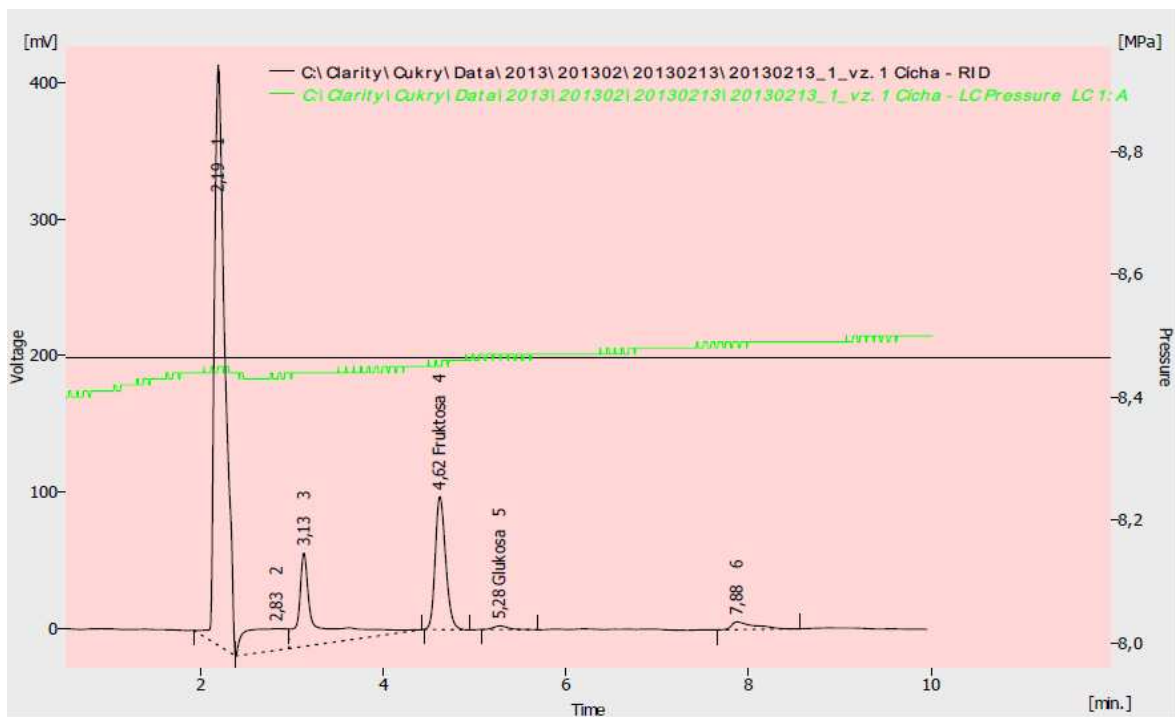
Chromatogram č. 2 - Děvín, pozdní sběr



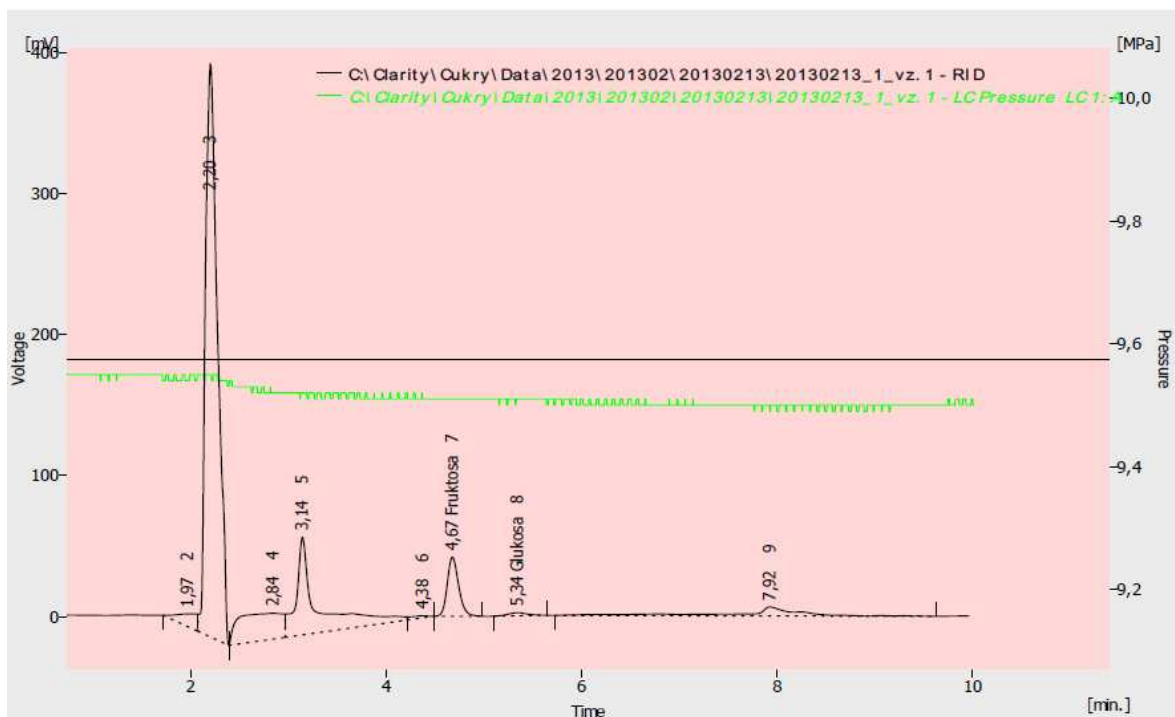
Chromatogram č. 3 - Muškát moravský, pozdní sběr



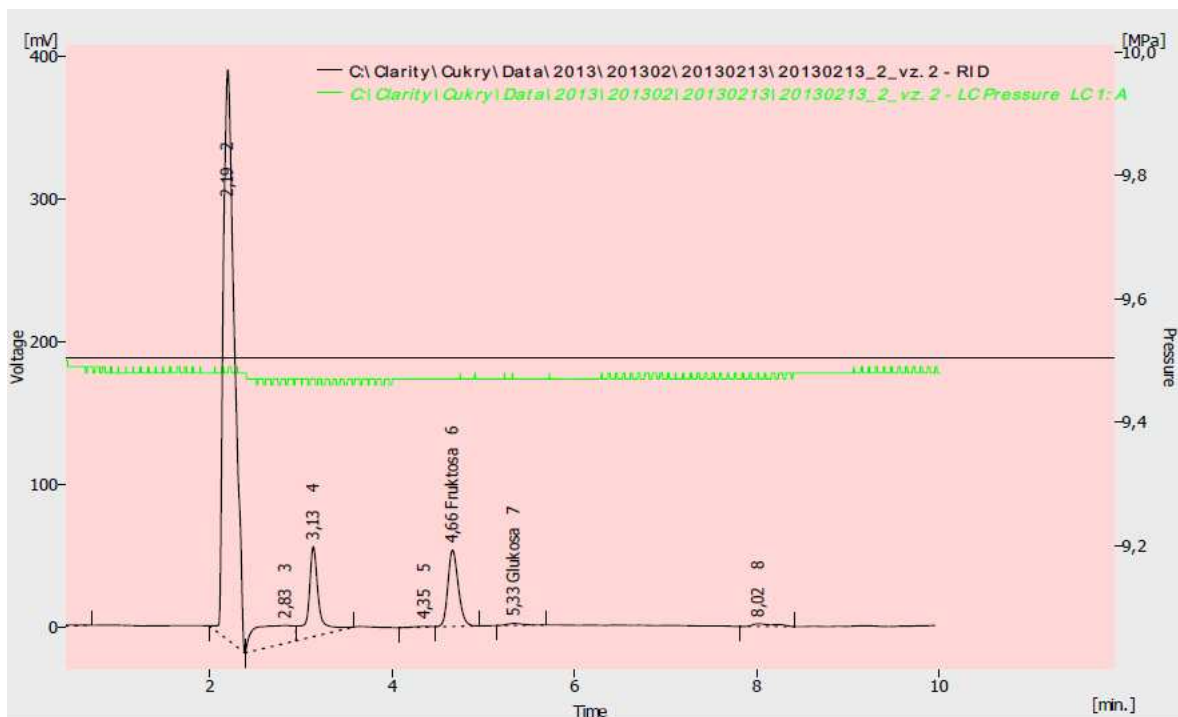
Chromatogram č. 4 - Tramín červený, výběr



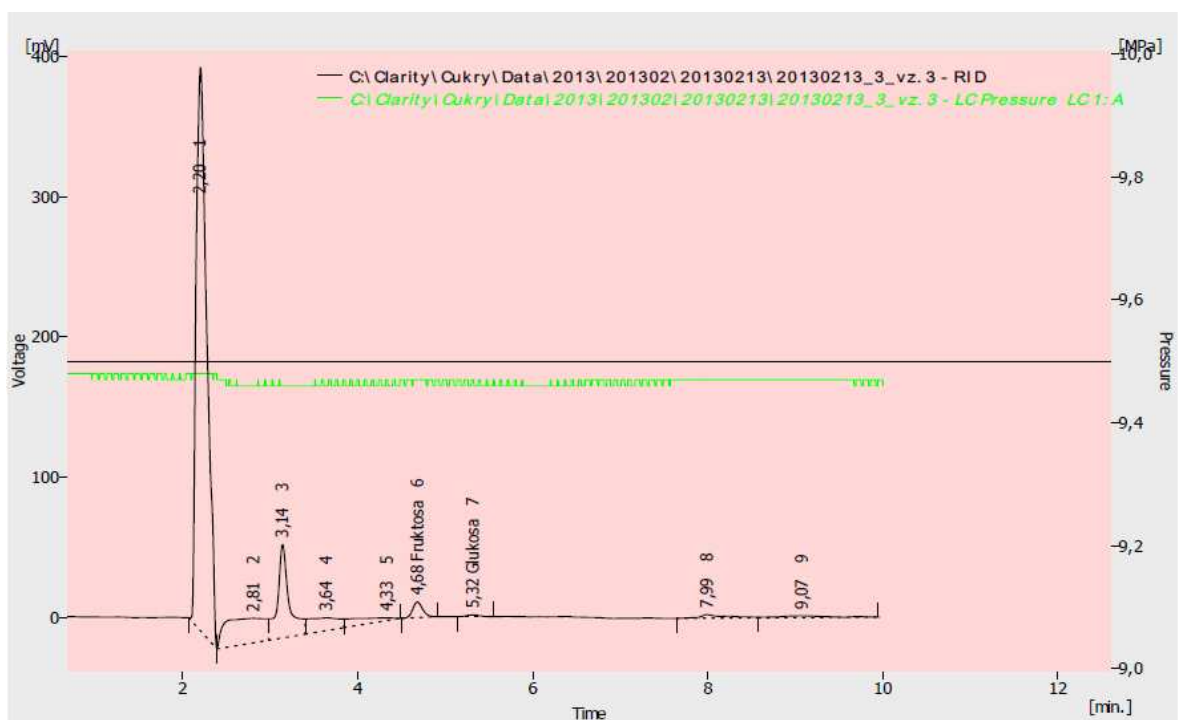
Chromatogram č. 5 - Rulandské bílé, výběr z hroznů



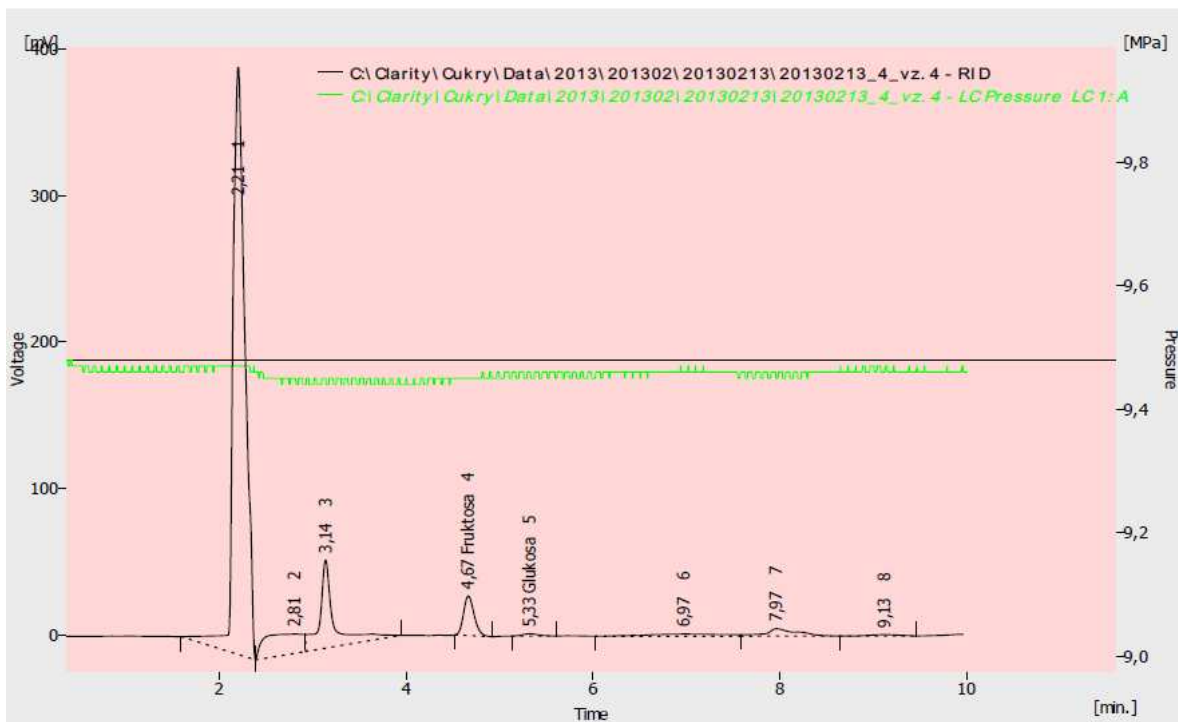
Chromatogram č. 6 - Chardonnay, pozdní sběr



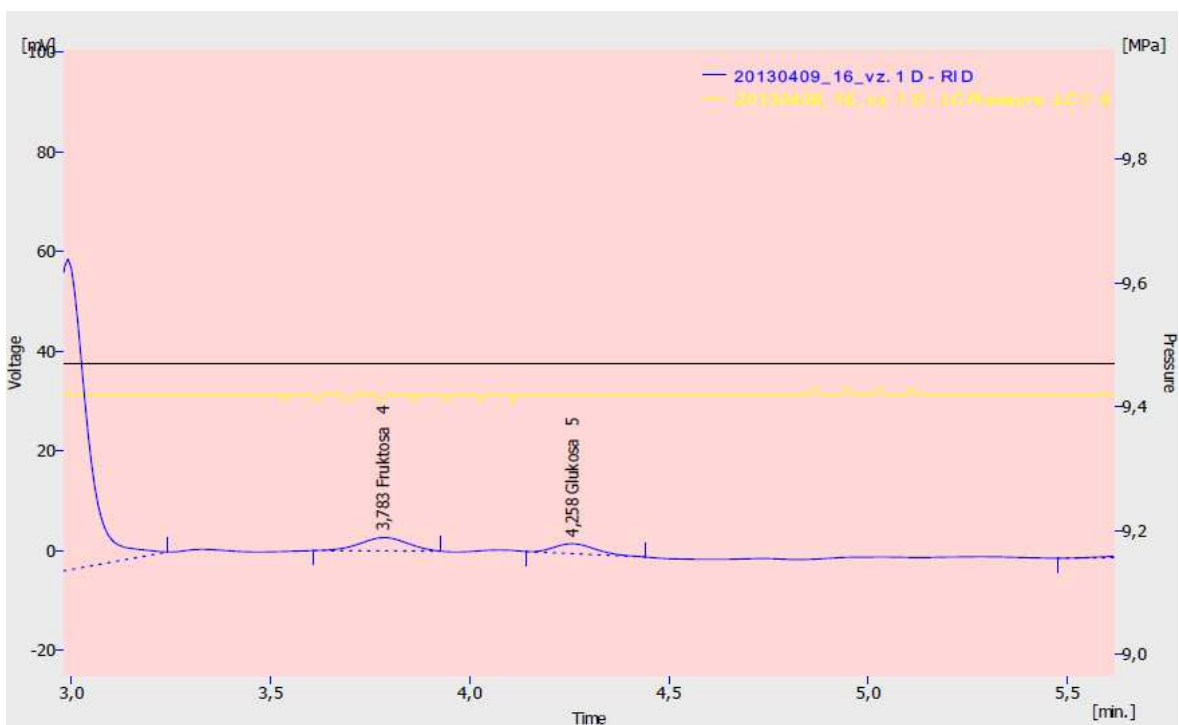
Chromatogram č. 7 - Sauvignon, pozdní sběr



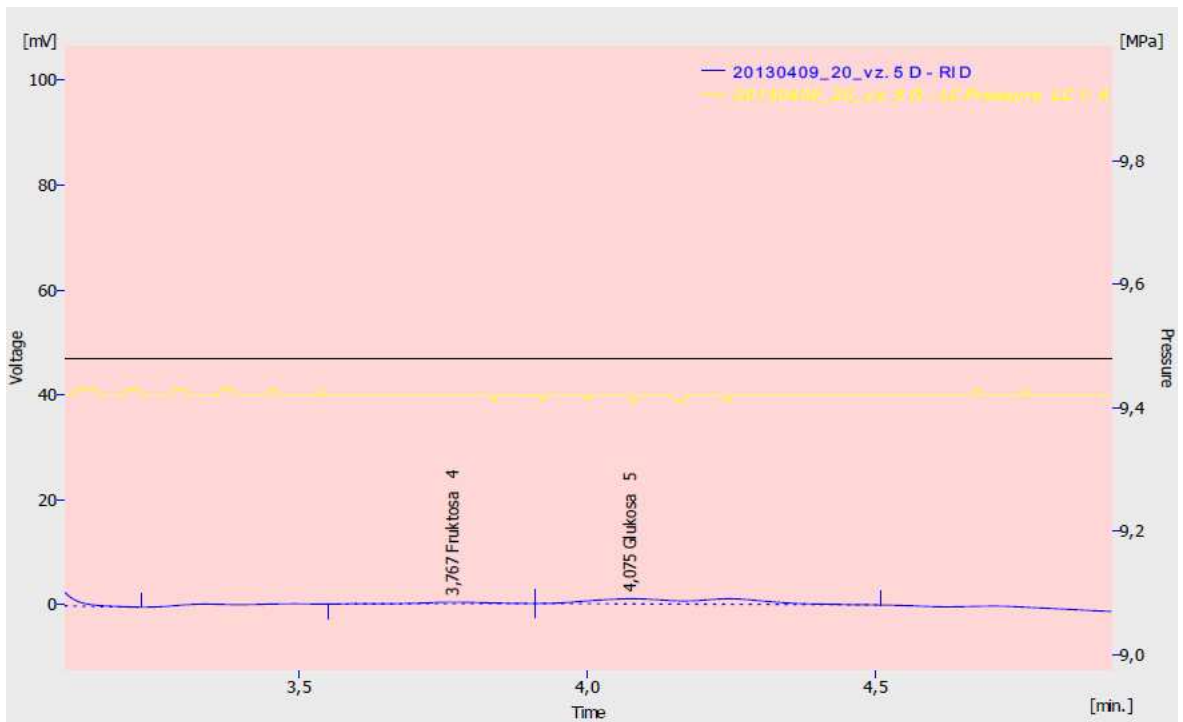
Chromatogram č. 8 - Ryzlink rýnský,, pozdní sběr



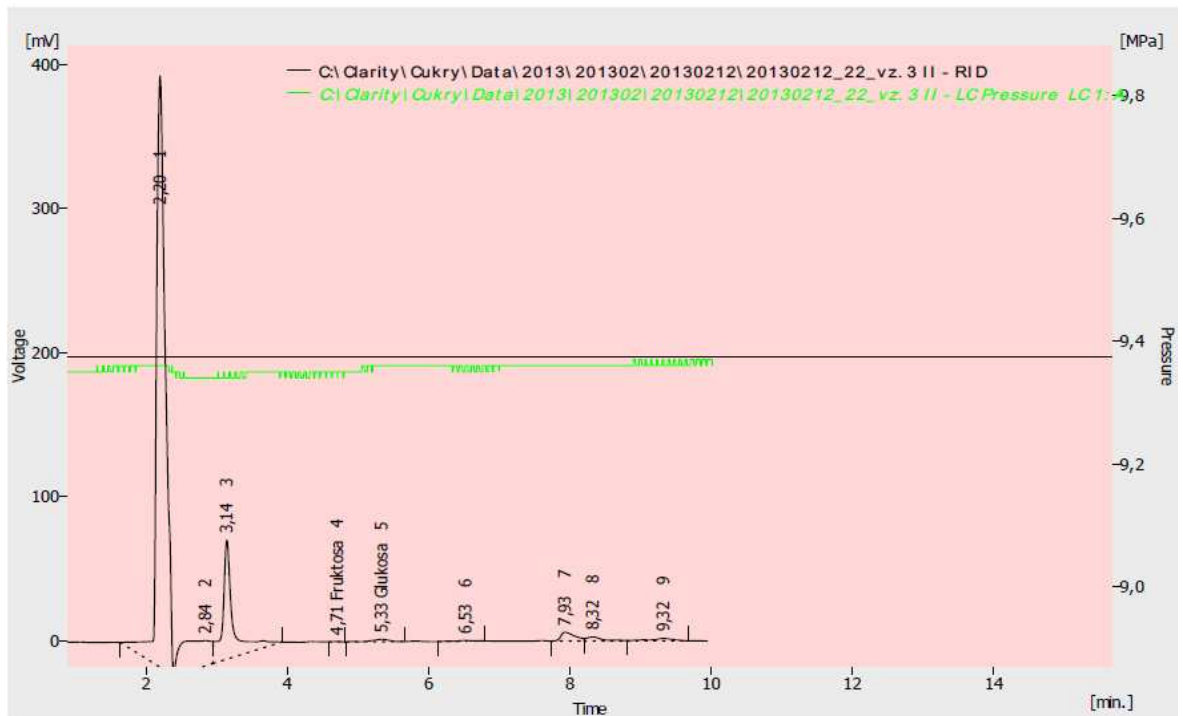
Chromatogram č. 9 - Müller Thurgau, pozdní sběr



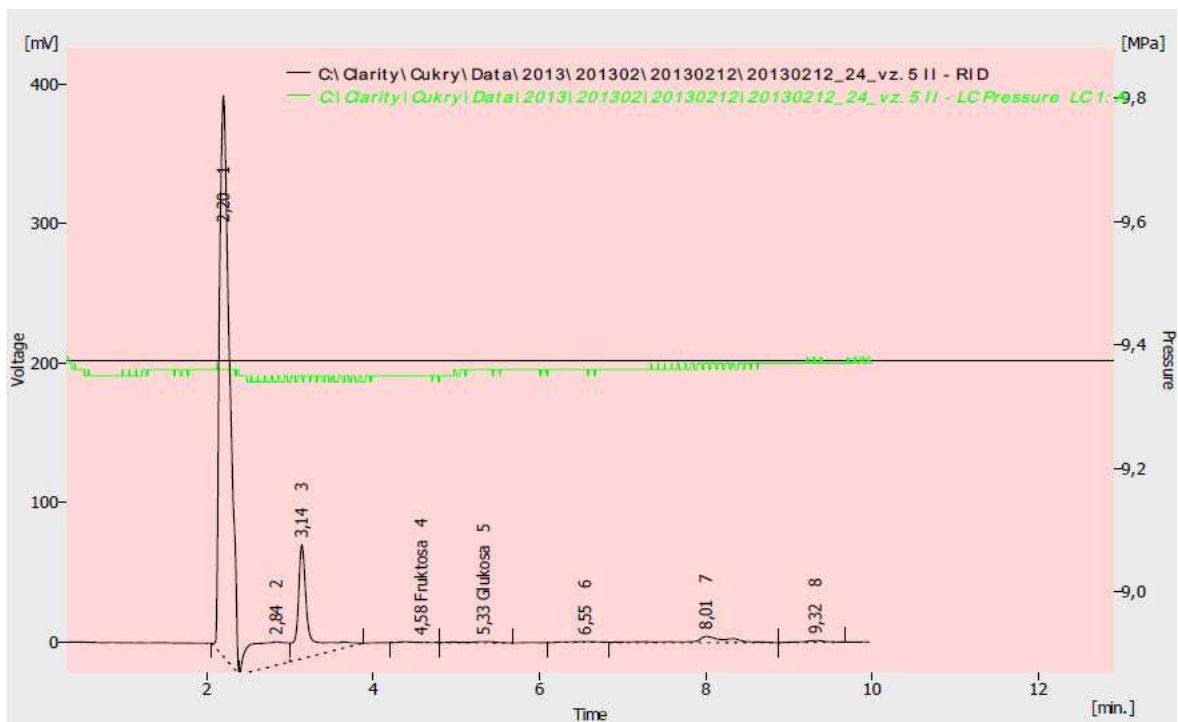
Chromatogram č. 10 - Modrý Portual, pozdní sběr



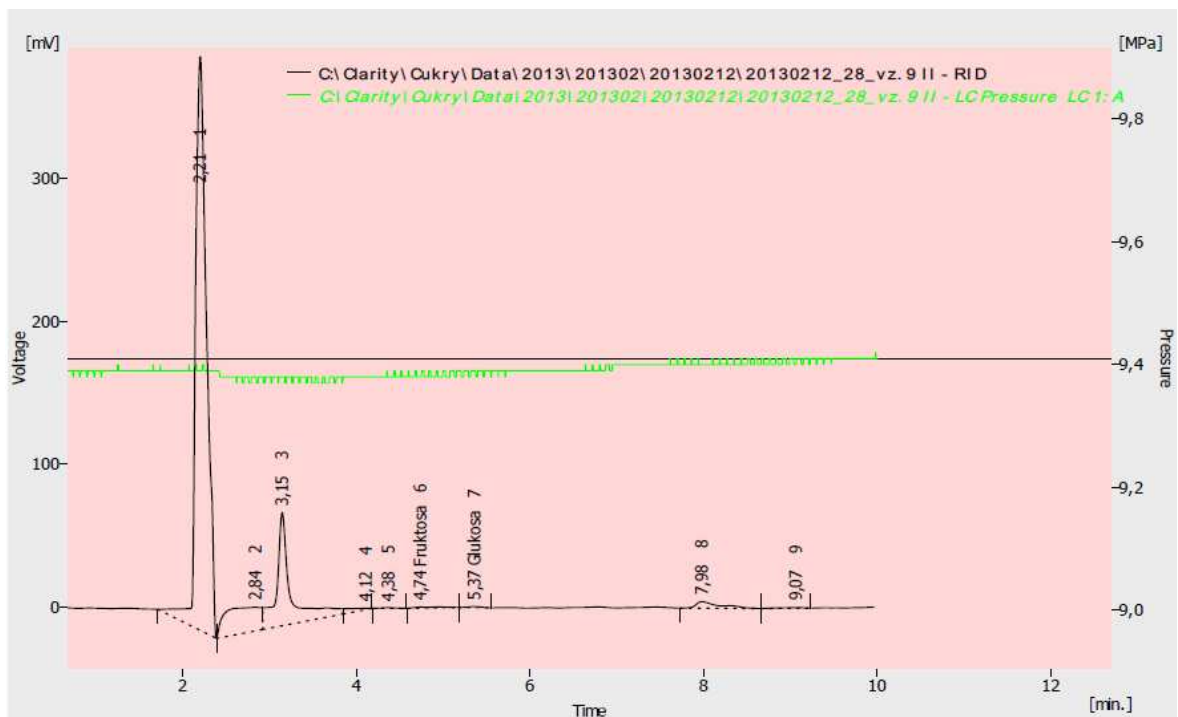
Chromatogram č. 11 - Frankovka, pozdní sběr



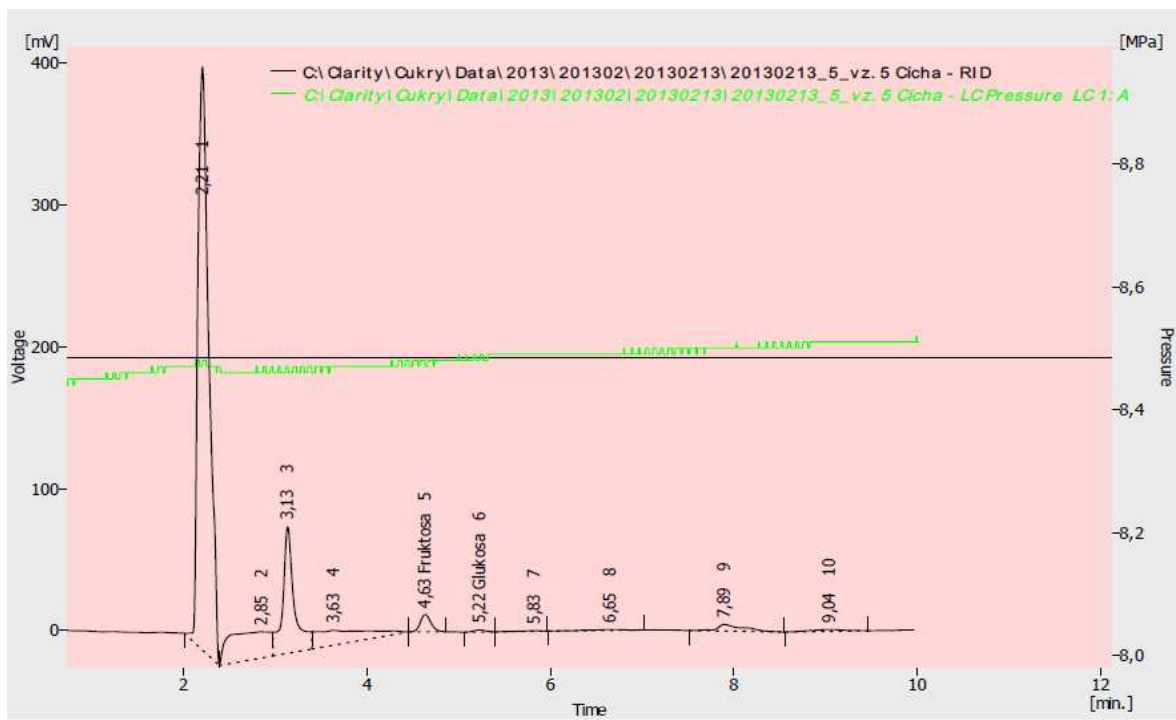
Chromatogram č. 12 - Cuvée červené, jakostní víno



Chromatogram č. 13 - Rulandské modré, výběr z hroznů



Chromatogram č. 14 - Cabernet Sauvignon, výběr z hroznů



Chromatogram č. 15 - Zweigeltrebe, výběr z hroznů