

Vliv malolaktické fermentace na obsah antioxidantů v červeném víně

Bc. Lucie Humpulová

Diplomová práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie HUMPULOVÁ**
Osobní číslo: **T09538**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Vliv malolaktického kvašení na obsah antioxidantů v červeném víně.**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Zpracujte odbornou literaturu týkající se malolaktického kvašení.
2. Vyhledejte v odborné literatuře vyzkoumané vztahy mezi obsahem antioxidantů a průběhem výroby vína.

II. Praktická část

1. Změřte obsah antioxidantů v definovaných vzorcích.
2. Vyhodnoťte naměřená data a porovnejte s odbornou literaturou.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1]KRAUS, V., FOFFOVÁ, Z., VURM, B., Nová encyklopedie českého a moravského vína, 1. vyd. Praha: Praga Mystica, 2008. 113 s. ISBN 978-80-86767-09-3

[2]IVELÍŠEK, Jan. Chemie potravin 3. Vyd. 2. uprav. Tábor : OSSIS, 2002. 343 s. ISBN 808665902X.

[3]JACKSON, Ron S. Wine science : principles, practice, perception [online]. 2nd ed. San Diego, CA. : Academic, [cit. 2011-02-06]. 654 s. ISBN 012379062X.

[4]MORENO-ARRIBAS, M; POLO, M. Wine chemistry and biochemistry [online]. New York : Springer, [cit. 2011-02-06] 735 s. ISBN 978-0-387-74118-5.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Pavel Hanuštiak

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

25. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2011

Ve Zlíně dne 21. března 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá vlivem malolaktické fermentace na obsah antioxidantů v červeném víně. V teoretické části byla popsána výroba červeného vína, malolaktická fermentace a antioxidanty ze skupiny polyfenolů. Součástí je také přehled chromatografických metod a bližší zaměření na metodu HPLC. V praktické části jsou pak vyhodnoceny výsledky laboratorních analýz. K analýze byly použity dvě odrůdy vína od dvou vinařů, odebíraných podle časového harmonogramu.

Klíčová slova: víno, malolaktická fermentace, bakterie mléčného kvašení, antioxidanty, polyfenoly, chromatografie, HPLC

ABSTRACT

This thesis deals with the influence malolactic fermentation on the content of antioxidants in red wine. The theoretical part describes the production of red wine, malolactic fermentation and group of polyphenol antioxidants. Also included is an overview of chromatographic methods and more focus on the HPLC method. The practical part is then evaluated the results of laboratory analysis. The analysis used two varieties of wine, two vintners, collected according to schedule.

Keywords: wine, malolactic fermentation, lactic acid bacteria, antioxidants, polyphenols, chromatography, HPLC

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce panu Ing. Pavlu Hanuštiakovi, za jeho odborné rady, připomínky a čas věnovaný konzultacím, které mi pomohly ke zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat také doc. Ing. Miroslavu Fišerovi a Ing. Lence Fojtíkové za konzultace a pomoc v laboratořích. Velké díky patří rovněž i mé rodině a mým blízkým za psychickou a morální podporu.

Motto:

„Dobré víno dělá dobrou krev, dobrá krev dělá dobrou náladu, dobrá nálada přináší dobré myšlenky, dobré myšlenky dávají velikost dobrým skutkům a dobré skutky dělají člověka člověkem“

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

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) 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:

◆ 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.

◆ 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 výtisky, opisy nebo rozmnoženiny.

◆ 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:

◆ 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 vzdělávacího 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:

◆ *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.*

◆ *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.*

◆ *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 přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.*

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	12
1 RÉVOVÉ VÍNO.....	13
1.1 VÝROBA ČERVENÉHO VÍNA.....	14
1.1.1 Odzrnění.....	14
1.1.2 Mletí.....	15
1.1.3 Macerace rmutu.....	15
1.1.4 Lisování.....	16
1.1.5 Příprava moštu pro kvašení.....	17
1.1.6 Kvašení rmutu.....	18
1.1.7 Makrooxidace a mikrooxidace.....	21
1.1.8 Jiné postupy pro výrobu červených révových vín.....	22
2 JABLEČNO-MLÉČNÉ KVAŠENÍ.....	24
2.1 KULTURY JMK.....	25
2.1.1 Použití čistých kultur.....	25
2.2 PODMÍNKY JMK.....	27
2.3 METABOLISMUS FENOLICKÝCH SLOŽEK.....	28
3 PŘÍRODNÍ ANTIOXIDANTY.....	29
3.1 ANTIOXIDANTY VÍNA.....	29
3.2 POLYFENOLY.....	30
3.2.1 Flavonoidy.....	31
3.2.2 Stilbeny.....	34
3.2.3 Fenolové kyseliny (hydroxy kyseliny).....	36
4 CHROMATOGRRAFIE.....	40
4.1 ROZDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD.....	40
4.1.1 Kapalinová chromatografie.....	41
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	45
5 CÍL PRÁCE.....	46
6 MATERIÁL A METODIKA.....	47
6.1 ANALYZOVANÝ MATERIÁL.....	47
6.2 STANOVENÍ ANTIOXIDANTŮ VE VÍNĚ METODOU HPLC-UV-VIS.....	47
6.2.1 Chemikálie a materiál.....	47
6.2.2 Použité pomůcky a přístroje.....	48
6.3 METODIKA.....	48
6.3.1 Postup pro naměření kalibračních křivek epikatechinu, katechinu, kyseliny gallové, resveratrolu, quercetinu, kyseliny kávové a skořicové.....	49
6.3.2 Postup pro stanovení antioxidantů ve víně.....	49
7 VÝSLEDKY A DISKUSE.....	50

7.1	KALIBRAČNÍ KŘIVKY STANDARDNÍCH LÁTEK ANTIOXIDANTŮ.....	50
7.1.1	Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení kyseliny gallové.....	50
7.1.2	Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení kyseliny kávové.....	50
7.1.3	Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení (±)-katechinu.....	51
7.1.4	Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení (-)-epikatechinu.....	52
7.1.5	Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení kyseliny skořicové.....	52
7.1.6	Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení resveratrolu.....	53
7.2	STANOVENÍ ANTIOXIDANTŮ VE VZORCÍCH VÍNA METODOU HPLC-UV-VIS.....	54
7.2.1	Stanovení antioxidantů ve vzorcích vína od vinaře č.1.....	54
7.2.2	Stanovení antioxidantů ve vzorcích vína od vinaře č.2.....	57
7.3	DISKUSE.....	62
	ZÁVĚR.....	65
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	66
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	70
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	72
	SEZNAM TABULEK.....	73
	SEZNAM PŘÍLOH.....	74

ÚVOD

Víno je nápoj čistě přírodní. Výroba hroznového vína je přirozený biologický proces, který šetrně uchovává a transformuje vše hodnotné, co réva načerpala z půdy, vzduchu, vody a slunce. Víno ve srovnání s tvrdým alkoholem či pivem, je hlavním zdrojem látek prospěšných našemu zdraví. Jejich množství a kvalitu ovlivňuje poloha vinice, složení půdy, charakter odrůdy, počasí, délka slunečního svitu v době vegetace, velikost úrody, způsob pěstování, chemická ochrana vinice i způsob zpracování moštu a ošetření vína

Obliba vína na celém světě neustále roste. V roce 2009 v ČR připadla spotřeba vína na osobu /rok na 18,7 l a to včetně kojenců. Není divu, vždyť hrozny jsou součástí našeho jídelníčku od počátku existence člověka a bylo by vskutku zvláštní, kdyby již lovci mamutů před desítkami tisíc let nepoznali účinky jejich zkvašené šťávy.

Výzkum ohledně složení vína a jeho preventivních účinků začal hlavně díky francouzskému kardiologovi, který se tím snažil vysvětlit velmi nízký výskyt infarktů mezi francouzskou populací. Je prokázáno, že u pravidelných konzumentů vína se projevují nižší sklony k srdečně-cévním onemocněním než u příjemců jiného alkoholu. Francouzi pijí víno každý den hlavně k jídlu - tato jejich záliba vede k prokazatelným krevním změnám, které pozitivně ovlivňují celý oběhový systém. Mohou za to látky se silnými antioxidačními účinky obsažené ve víně – mezi nejznámější patří polyfenoly a flavonoidy. Mezi známé a hojně propagované antioxidanty patří resveratrol – této látce vědci věnují velkou pozornost. Resveratrol má v našem těle zajímavé účinky - snižuje především přilnavost cholesterolu k cévním stěnám, čímž preventivně působí proti vzniku aterosklerózy, byly také prokázány jeho protinádorové účinky.

Termínem antioxidanty jsou označovány sloučeniny, které přerušují nebo zabraňují řetězovým reakcím způsobené oxidací. Z hlediska chemické podstaty jsou antioxidanty velmi různorodou skupinou a proto se liší i chemická podstata jejich antioxidačního působení (reakcí s radikály přerušují řetězovou radikálovou reakci, váží do komplexů katalyticky působící kovy, reakcí s kyslíkem snižují jeho množství aj.) Mechanismus účinku antioxidantů spočívá především v tom, že poskytují atomový vodík ke zneškodňování peroxidových nebo jiných radikálů, vznikajících jako meziprodukty řady oxidačních procesů.

V této diplomové práci byla pro analýzu použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography), která se řadí mezi nejčastěji používané separační metody. Vyniká vysokou účinností, dobrou opakovatelností a

robustností. Tato metoda je vhodná pro dělení netěkavých a polárních látek, jejichž analýza příbuznou plynovou chromatografií bývá často obtížná.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 RÉVOVÉ VÍNO

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

Pěstování vinné révy je podmíněno vhodnými klimatickými a geologickými podmínkami. Francouzské přísloví říká, že *odrůda je matkou vína, půda a poloha jsou otcem vína a ročník je jeho osudem*. [2]

Révové víno, ač nepatří mezi základní potraviny, obsahuje i látky nezbytné pro výživu člověka, jako sacharidy, bílkoviny, mastné kyseliny, vitaminy a minerální látky.[2]

Hrozny jsou surovinou na výrobu přírodních, perlivých, šumivých a dezertních vín, vinných destilátů a též slouží jako významná konzumní odrůda.[6] Toto rozdělení a jejich použití je přesně definováno zákonem č 321/2004 Sb. o vinohradnictví a vinařství.

Hrozny se skládají z bobulí a stopek (třapin). Dužnina představuje až 90% hmotnosti hroznů; obsahuje hlavně vodu, jednoduché cukry (glukosa a fruktosa), kyseliny (vinná a jablečná), dusíkaté a minerální látky. Nejcennějšími složkami slupek jsou barviva a aromatické látky. Semena jsou pak zdrojem tříslovin a olejů.[6]

Definice vína přijatá hospodářskou komisí Evropské unie zní: „Vino je produktem vzniklým pouze alkoholovým kvašením, úplným nebo částečným, čerstvých hroznů, rozemletých či celých, nebo moštu získaného z hroznů.“ [4]

Podle francouzského enologa Emile Peynaud by mohla enologická definice vína znít: „Vino je nápojem vznikajícím kvasnou činností buněk kvasinek, a v určitých případech buněk mléčných bakterií, ze šťávy rozdrčených nebo macerovaných buněk hroznů.“[4]

V současnosti je známo několik tisíc odrůd, z nichž se v praxi využívá pouze několik set.

Základní principy zpracování vinné révy na víno jsou dostatečně patrné z technologie dvou základních, tj. bílých a červených vín, které se odlišují zejména v počátečních fázích technologického postupu.[2]

1.1 Výroba červeného vína

Hlavní kroky v technologii výroby červeného vína jsou sklizeň hroznů, odzrňování a drcení, nakvášení, lisování, dokvášení, biologické odbourávání kyselin, stáčení a školení vína.[4]

Výroba vína začíná sklizní hroznů. V našich klimatických podmínkách a zeměpisné poloze dozrávají koncem srpna, v září a začátkem října, kdy se sklízají. Sklizené hrozny se ihned dopravují do vinařských závodů k dalšímu zpracování, které má následovat ještě téhož dne.

Na přejímce je zjištěna hmotnost, průměrná cukernatost, jakost dle zdravotního stavu, odrůdy a obsahu cukru. Ke zjištění cukernatosti se využívají moštoměry. U nás se cukernatost vyjadřuje ve °ČNM (československý normalizovaný moštoměr), který udává množství cukru v kg na 100 l moštu, nebo ve °Kl (Klosterneuberský moštoměr), udávající množství cukru v procentech hmotnostních při 20 °C. V automatizovaných linkách se cukernatost zjišťuje zpravidla refraktometricky.[2]

Termín sklizně se neřídí jen obsahem cukrů v bobulích. Sleduje se zároveň obsah kyselin a poměr mezi kyselinou vinnou a jablečnou, jejíž obsah by měl být nízký, aby se jí nemuselo odstraňovat velké množství při malolaktickém kvašení, které následuje po kvašení. Důležité je pozorovat chuť a barevné změny bobulí. Při dozrávání pečičky hnědnou, konzistence dužniny se stává tekutou, snižuje se množství trpkých látek, slupka je křehká a mění se také odrůdové aroma. U modrých odrůd je žádoucí, aby cukernatost sklizených hroznů dosahovala alespoň 19-21 °NM.[4]

V technologii výroby červeného vína hraje významnou roli „fenolická zralost hroznů“. Barvu červených vín tvoří antokyany a chuť vzniká na základě obsahu a složení taninů. Významné pro kvalitu červených vín jsou veškeré fenolické látky, které jsou mnohem důležitější než aromatické látky.

Koncentrace, povaha a struktura taninů se mění v souvislosti se zráním hroznů, ale i s technologií používanou pro výrobu vína.

Kvalita fenolů, se kterými přicházejí hrozny ke zpracování, se vytváří ve vinici. Mezi faktory ovlivňující tuto kvalitu patří klimatické podmínky ve vinici, poměr mezi listovou plochou a hmotností hroznů, stresová situace.[1]

1.1.1 Odzrňení

Dnes nejběžnější začátek technologického postupu při zpracování modrých hroznů zahrnuje odzrňování, mletí a pumpování do kvasných nádob. Při odzrňování dojde

k jemnému otrhání bobulí od třapin, které zůstanou nepoškozené. Rozemleté hrozny s třapinami nebo i po odzrnění se pak nazývají rmut.[2,4]

Odzrněná drť zlepšuje chuťové vlastnosti vína a zvýší se výtěžnost alkoholu o 0,5 %. Třapiny totiž neobsahují cukr, ale nasávají při kvašení alkohol. Zároveň ochuzují mladé víno o barevné složky. Naproti tomu neodzrněná drť lépe kvasí. Třapiny absorbují kalorie a limitují přebytek tepla, při míchání strhávají vzduch do rmutu a zlepšují lisování rmutu. Odzrnění se provádí na různých typech vystíracích či odstředivkových odzrňovačů, v nichž se v perforovaném válci zachycují třapiny, kdežto rmut jím protéká do sběrné nádrže. Oddělené třapiny vypadávají nebo jsou vyhrnovány.[2,4]

Třapina má málo kyselin a mnoho draslíku, proto se odzrňováním zvyšuje obsah kyseliny o 0,5 g/l. V některých oblastech se přidává 5-20 % vyzrálých třapin zpět do drtě, což se osvědčilo zvláště při zpracování mírně nahnílených hroznů, v nichž bývá nižší obsah tříslovin.[4]

1.1.2 Mletí

Mletím bobulí se naruší slupka a vyteče z nich šťáva a dužnina. Přitom se nesmí narušit pečičky, jejichž třísloviny mají velmi svíravou chuť. Mletí usnadňuje přepravu drtě pumpou. Při kvašení se pak lépe zformuje matolinový klobouk a kvasinky snáze prostoupí dužninu vyteklou z bobulí. Zlepšením kontaktu mezi šťávou a slupkami bobulí se zlepšuje výsledek macerace. Díky tomu se SO₂ lépe rozptýlí v rozemleté drti, která po vykvašení neobsahuje zbytky cukru, zůstávající v nedostatečně rozdrcených bobulích. Mletím bobulí se uvolní pečičky a do vína přejde více tříslovin. Je-li mletí příliš rázné, rozpouští se větší množství svíravých polyfenolů a obsah taninů se zvyšuje rychleji nežli vyluhováním barvy a vzniká nerovnovážený stav. Mletí rovněž zvyšuje množství kalů i kvasnic.[4]

1.1.3 Macerace rmutu

Délka vlastního kvašení se v průběhu kampaně zkracuje vlivem mohutného rozmnožení kvasinek ve všech zpracovatelských prostorách. Po 5 až 8 dnech bývá kvašení ukončeno a následuje období macerace rmutu (vyluhování rmutu) v mladém víně, kdy probíhá vyluhování červeného barviva a tříslovin ze slupek modrých bobulí.

Délka macerace se volí podle požadovaného typu vína. Krátká macerace trvá několik dnů a provádí se při tvorbě vín lehčích a určených pro konzumaci během jednoho roku. Dlouhá macerace může trvat 14 až 21 dnů, ale i déle, a provádí se při tvorbě vín plných a dlouhověkových. Doba, kdy se má macerace ukončit, se určuje jednak podle průběžného

ochutnávání, jednak podle výsledků chemické analýzy zaměřené na obsah barviv a polyfenolů, případně v závislosti na průběhu biologického odbourávání kyselin (BOK), které se začne při dlouhodobé maceraci samovolně rozvíjet.[4]

Technologie výroby červeného vína macerací rmutu neboli macerací na slupkách či nakvášením je nejběžnější technologií.

Taniny ze slupek se alkoholem extrahují snadněji, zatímco ze semen obtížněji, a to díky silné vrstvě kutikuly na semenech.

V závislosti na přítomnosti alkoholu ve rmutu se rozlišují tři stádia macerace

1. Předfermentační macerace – může probíhat několik hodin až několik dnů
2. Alkoholové kvašení – zvyšuje se obsah alkoholu, současně se extrahují taniny ze slupek a později i ze semen
3. Pofermentační macerace – mezi 10 – 16% obj. alkoholu.

Teploty při maceraci by se měly pohybovat v rozsahu 28 – 30 °C. Pro velmi dobrou extrakci taninů a barviv jsou vhodné teploty 30 – 35 °C [2]

Maceraci lze provádět:

- ◆ v otevřené nádobě
- ◆ pomocí „sprchování“ moštem
- ◆ ve vinifikátorech

Kvašení odzrněných, ale nerozemletých bobulí (semikarbonická macerace) dodá vínům zvláštní aroma a strukturu.[4]

Vína z odzrněných rmutů jsou chuťově jemnější a jakostnější. Hůře se však lisují a pomaleji se čistí, neboť obsahují méně tříslovin. Pro zlepšení lisovatelnosti se přidávají pektolytické enzymové preparáty.

Další operací může být scezování nebo může být součástí lisovacího procesu. Slouží k oddělení nejkvalitnější části moštu, **samotoku**. Provádí se ihned po předchozí operaci, aby se předešlo okysličení moštu a jeho obohacení tříslovinami vyluhujícími se z třapin [2].

1.1.4 Lisování

Lisování má za účel oddělení šťávy, která byla uvolněna z buněk předchozími technologickými operacemi. Rmuty se lisují v lisech různých konstrukcí. Používají se

periodické i kontinuální lisy, hydraulické i pneumatické lisy. Při zpracování modrých hroznů a při výrobě červených vín se před lisováním rmut nakvašuje 4 – 14 dnů dle požadovaného charakteru vína. Nejčastěji se nakvašuje při teplotě 20 – 25 °C v závislosti na zpracovávané odrůdě. Při nakvašování přecházejí barviva ze slupek a tříslovin z pečiček do rmutu. U moderních výrobních linek se nakvašuje kontinuálně pod tlakem oxidu uhličitého [2].

První podíl vylisovaného moštu (samotok) je nejkvalitnější, neboť obsahuje nejméně tříslovin, a proto se někdy zpracovává odděleně. Pevné vylisované zbytky hmoty bobulí se nazývají **matolina** [2].

1.1.5 Příprava moštu pro kvašení

Pro kvašení se drť připravuje vhodnými postupy, mezi něž patří zasíření, zlepšování obsahu cukrů, okyselování, odkyselování, tepelná úprava, přidání kvasinek, enzymů nebo čířidel, popřípadě oenotantinů atd.

Odkalování moštu slouží k oddělení hrubých kalů a nečistot, s nimiž se částečně strhávají i kontaminující mikroorganismy. Odkalují se mošty z kontinuálních lisů a mošty z mechanicky a mikrobiálně poškozených hroznů.

Provzdušňování se dělá u zdravých moštů skladovaných v nepropustných tancích a nádržích. Prosycení moštu kyslíkem je nezbytným předpokladem dobré činnosti kvasinek.

Sířením se ničí oxidační enzymy (polyfenoloxidas, tyrosinasy a laktasa z bobulí napadených plísní šedou) a současně se chrání aromatické látky před nadměrným okysličováním. Zastaví se i rozmnožování octových bakterií a „divokých“ kvasinek, které se okamžitě po rozdrocení bobulí rychle množí.[4]

Do drtě ze zdravých hroznů se přidává SO₂ v množství 20-30 mg/l. Jsou-li hrozny přezrálé a s nízkým obsahem kyselin nebo nahnílé, zvýší se dávka až na 50 mg/l. Účinnost zasíření se řídí také hodnotou pH. Čím je pH vyšší, tím vyšší musí být dávka SO₂. SO₂ kromě potlačení činnosti nežádoucích mikroorganismů, zejména bakterií a divokých kvasinek, současně ovlivňuje sensorický charakter následného vína podporou tvorby glycerolu.[2,4]

Nejstarší způsob síření je spalování sirných knotů.[6] Další způsob je použití tekuté formy oxidu siřičitého, který je v drti rovnoměrně rozptýlen. Roztok se nechá plynule odkapávat do proudu čerpané drtě. Vydatnost přidávání oxidu siřičitého je řízena plovákovým systémem na základě mohutnosti proudění drtě. Při síření pyrosulfitem draselným je důležité následné rozptýlení mícháním nebo přečerpáváním.[4]

Nadbytečné množství oxidu siřičitého je možné odstranit z vína scelením peroxidem vodíku a nebo provzdušněním mladého vína.[6]

Odkyselování má za účel snížit kyselost moštů s nízkým obsahem cukru. Odkyseluje se buď čistým vápencem, který váže kyselinu vinnou, nebo průtokem přes vrstvu anexu, případně míšením kyselých moštů s méně kyselými (tzv. scelování).[2]

Okyselování se provádí v letech s nízkým obsahem kyselin v moštu. Přidává se kyselina vinná v množství 1 – 2 g/l, tak aby celková kyselost byla 7 - 8 g/l.[2]

Úprava cukernatosti se provádí přidavkem cukru zahuštěným moštem. Optimální poměr je 20 – 25 °ČNM cukru na 6 – 10% kyselin. Při doslazování je nutno postupovat opatrně, aby se nezměnil odrůdový charakter vína.[2] Zvyšováním cukernatosti se zvýší také obsah alkoholu, který dodá budoucímu vínu plnost a zlepší vyluhování barviv během kvašení. Cukr (obvykle řepný) se musí přidávat najednou v plné dávce, hned před zahájením kvašení. Přitom se počítá s tím, že odzrněná drť obsahuje asi 15 % matolin. Vína s přívlastkem se cukřit nesmějí.[4]

Přidání čistých kultur kvasinek do drtě při kvašení je nezbytné k rychlému rozkvašení a k dostatečně intenzivnímu i čistému prokvašení bez zbytkového cukru. K tomu je současně nutné zvýšit startovací teplotu na 18-20 °C.[4]

Pektolytické enzymy urychlují vyluhování barviv z buněk slupky a tím lze zkrátit kvasný proces. Používají se hlavně pro výrobu mladých vín určených k rychlé spotřebě.[4]

Do drtě z méně zralých nebo narušených hroznů se přidává moštová želatina k odstranění trpkých příchutí. Při výrobě některých typů červených vín je zvykem přidávat tanin ke zvýšení struktury vína. K tomu jsou vhodné jen velmi jakostní taniny katechické, které mají stejnou strukturu jako taniny obsažené v hroznech. Nevhodné jsou levné galotaniny, které nedokáží stabilizovat antokyany. Přidávání taninů do drtě je však méně výhodné vzhledem k nutnosti vyššího dávkování. Vhodnější je tak přidat taniny do mladého vína po ukončení biologického odbourávání kyseliny jablečné.[4]

1.1.6 Kvašení rmutu

Ve vinařství se používají kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (synonyma *Saccharomyces vini*, *Saccharomyces ellipsoideus*) s různými názvy dle místa původu.

Stále více se používají ve formě SSVK – aktivovaných sušených vinařských kvasinek. Dříve se využívalo především spontánní kvašení způsobené kvasinkami ulpělých na povrchu hroznů. Dnes se upřednostňuje řízené kvašení. Zákvas se připravuje v množství

1% veškerého moštu namnožením vhodné rasy vinných kvasinek v malém podílu sterilního moštu. Silně sířené mošty se zakvašují kvasinkami adaptovanými na oxid siřičitý.[2]

Připravená drť se přečerpá do kvasných nádob (vinifikátorů), kde se začne rozvíjet kvasný proces. První známkou počátku kvašení je vyplavování pevných částí drtě na povrch kvasící tekutiny, kde vytvoří postupně se zpevňující matolinový klobouk.[4]

Drť obsahuje alkohol a oxid uhličitý. Matolinový klobouk je nadlehčován unikajícím CO_2 a jenom menší část je potopena do kvasícího moštu. Větší část vyčnívá nad hladinu, má kyprou strukturu a v mezerách se CO_2 mísí se vzduchem. Tím vzniká prostředí vhodné pro rozvoj octových a mléčných bakterií, neboť je tam kromě cukrů a alkoholu též vysoká teplota vznikající při kvašení. Pro optimální nakvášení rmutu, je nezbytné vytvořit takové podmínky, aby byl matolinový klobouk buď čas od času navlhčován nebo potápěn, či neustále potopen. Ponořováním se snižuje teplota uvnitř klobouku a současně se provádí částečné okysličení nakvašeného rmutu. Z velkého povrchu klobouku se odpařuje značné množství alkoholu a unikají aromatické látky, což je možné snížit zakrytím kádě. K různým způsobům ošetřování matolinového klobouku se využívají i odlišné kvasné nádoby.

Kvasné nádoby:

- ◆ dřevěné otevřené kádě s ručním ponořováním matolinového klobouku
- ◆ betonové, uzavřené nádrže – ke skladování hotových vín
- ◆ nerezové nádrže – uzavřené nádrže s mechanickým mícháním (rototanky), nebo s hydraulickým ponořováním či automatickým způsobem překrácení matolinového klobouku (vinifikátory)

Pro kvalitnější vína se doporučuje větší počet menších nádrží do obsahu 50-150 hl. Nádrže větších objemů bývají příliš vysoké. Matolinový klobouk je v nich velmi stěsnaný a má nedostatečný kontakt s kvasícím moštem. Klobouk se v takových nádobách hůře provzdušňuje, vína mají méně výraznou barvu a jsou méně tělnatá.[4] Tělem vína se rozumí extrakt hroznové chuti a obsah alkoholu poskytující společně v ústech dojem plnosti.

Samotné kvašení má tři fáze:

Začátek kvašení je charakteristický pozvolným rozmnožováním kvasinek a pomalým začátkem prokvašování cukrů moštu a trvá 2 – 3 dny

Bouřlivé kvašení nastává třetí až čtvrtý den a projevuje se vývinem tepla, zvýšením teploty až na 25 °C a uvolňováním CO₂, který strhává i aromatické a těkavé buketní látky. V této fázi kvašení se musí regulovat teplota v rozmezí 15 - 18 °C a u psychrofilních kvasinek v rozmezí 10 – 12 °C. Bouřlivé kvašení trvá několik dnů až týdnů.

Dokvašování nastává po poklesu cukru na obsah 2 – 5 g/l a trvá 1 – 2 měsíce, někdy i půl roku. Činnost kvasinek se postupně omezuje, až zcela ustane. Po ukončení kvašení a zastavení vývinu CO₂ začnou kvasinky sedimentovat na dno tanků a usazují se i kaly. V období od ukončení alkoholového kvašení do stáčení vína z kvasničných kalů probíhá tvorba révového vína. Probíhají při ní různé biologické a fyzikálně chemické procesy – biologické odbourání kyselin (jablečno-mléčné kvašení). Tyto procesy jsou doprovázeny vylučováním vinného kamene ve formě vinanu vápenatého a hydrogenvinanu draselného a procesy samočištění vína při nichž se srážejí a sedimentují shluky molekul opačného náboje organického i anorganického charakteru. Čištění vína lze urychlit čířením. Dokvašené víno se odděluje od sedimentu kalů a kvasinek stáčením do čistých zasířených kvasných tanků. Při prvním stáčení se víno provzdušní a vysráží se další kaly, především tříslobílkovinné. Proto se po 6 až 8 týdnech víno stáčí znovu. Víno po ukončení kvašení se nazývá **mladé víno**. [2]

Vyluhování látek před kvašením se doporučuje hlavně pro odrůdy s nižším obsahem antokyanů a pro zachování bohatého obsahu aromatických látek, jakož i pro získání jemných, sladkých taninů ze slupek pro vína vyšší kvality. Drť se udržuje 7 až 14 dní při teplotě 2 – 4 °C s případným jemným promícháváním. Pak se zahřeje na 18 °C a okamžitě se nastartuje její kvašení.

Vyluhování látek během kvašení má své zákonitosti. V průběhu prvních 8 dnů se zvyšuje vyluhování barevných složek rychleji nežli vyluhování tříslovin. Potom barevná intenzita klesá, až se ustálí na určitém, rovnovážném stavu. Vyluhování polyfenolů probíhá sice pomaleji, ale nepřetržitě po dobu 30 dnů i déle. K výraznému zvyšování intenzity obou složek přispívá postupné zvyšování teploty a u tříslovin také prodlužování doby kontaktu se rmutem – macerace. Při kvašení rmutu se mohou teploty pohybovat do 32-35 °C bez rizika změny typu vína.

Dalším faktorem, který ovlivňuje intenzitu vyluhování, je pohyb. Přečerpávání a rozstříkávání kvasícího moštu na plovoucí matolinový klobouk, remontáž, zvyšuje více vyluhování antokyanů nežli polyfenolů.

Intenzita vyluhování je závislá nejen na požadovaném typu výsledného vína, ale také na odrůdě révy vinné a terroir (objektivní vliv podloží, půdy, počasí, vody, slunce)

Na počátku kvašení se velmi rychle rozpouští aromatické látky vlivem zvyšujícího se obsahu alkoholu. Ke konci kvašení působí vyšší obsah alkoholu na zvýšené vyluhování tříslovin z pečiček, což má význam pro stabilizaci barvy.[4]

1.1.7 Makrooxidace a mikrooxidace

Makro- a mikrooxidaci lze použít jen u vín, která mají dostatečné množství fenolických látek, aby tak došlo ke zlepšení kvality vína, nikoliv k projevu vady vína.

Makrooxidace probíhá u červených vín prakticky již při kvašení a maceraci. Přístup kyslíku pozitivně působí na dynamiku kvašení, minimalizuje výskyt sirky a v případě JMK přímo na rmutu přispívá k rychlejšímu odvětrání tónů, které při JMK vznikají.

Mikrooxidace je technologický proces, během něhož přivádíme velmi malá množství kyslíku do vína. Cílem je dosáhnout žádoucích změn v aroma a ve struktuře chuti vína. Tento technologický krok působí na zlepšení intenzity barvy vína, zvýšení stability produktu proti oxidaci a snížení reduktivního charakteru červeného vína.

Velmi důležitou úlohu v mikrobiálních a biochemických dějích při výrobě vína hraje kyslík. Významný je vliv kyslíku i na fenolické látky ve víně. Fenoly představují základní substrát pro oxidaci a jsou nezanedbatelné i z pohledu organoleptických vlastností vína.

Význam mikrooxidace:

- ◆ stabilizuje barvu vína tvorbou komplexů mezi antokyany a taniny
- ◆ působí na zjemnění chuti a zvýšení její plnosti

V průběhu mikrooxidace se odlišují dvě fáze:

- ◆ strukturální fáze – charakteristická zvýšením tvrdosti a agresivity chuti
- ◆ fáze harmonizace – charakterizuje ji zvýšení jemnosti taninů, všeobecné zvýšení komplexnosti a plnosti vína

Mikrooxidace lze aplikovat po ukončení alkoholového kvašení nebo JMK. Přirozená mikrooxidace probíhá v dřevěných sudech, ve velkovýrobě využívá dávkovací zařízení.

Pro mikrooxidaci je důležitá teplota 12-16 °C. V průběhu ležení vína v sudech je pak nutné kontrolovat vznik oxidázy. V těchto případech je pak nutné aplikovat SO₂. [1]

1.1.8 Jiné postupy pro výrobu červených révových vín

Výroba červeného vína teplou cestou je náročnější na technologické vybavení. Metoda je založena na zahřívání rmutu na teplotu 65 – 80 °C po velmi krátkou dobu.

Metoda je vhodná pro:

- ♦ hrozny, u nichž je v době sklizně vyšší napadení šedou hnilobou, napadení však nesmí překročit 30%
- ♦ hrozny s nedokonalou fenolickou zralostí
- ♦ výroba vína pro brzkou konzumaci (listopad, prosinec)

Zahřívání rmutu umožňuje velmi rychlé uvolňování antokyanových barviv do moštu. V případě, že hrozny obsahují větší množství nezralých taninů, zejména v semenech, nedochází k jejich extrakci do vína. Kvůli zlepšení chuti a stability vína je významné použití enologických taninů.

Výroba vína karbonickou macerací je velmi stará metoda výroby vína. Moderní verzi této technologie zavedl Michal Flanzy v roce 1935. Stala se základem výroby „primeur“ vín, tzn. červených vín, která se konzumují v mladém stavu v období listopadu až prosince.

Karbonická macerace je způsobem anaerobní macerace celých nepoškozených bobulí umístěných do atmosféry oxidu uhličitého.

Výhody karbonické macerace:

- ♦ tvorba jedinečného ovocného aroma – třešně, višně a maliny
- ♦ snížení extrakce tzv. „hrubých taninů“, proto je možné pro tuto technologii využít i hrozny s nedokonalou fenolickou zralostí a vyšším podílem „hrubých taninů“

Technologie není vhodná pro výrobu červených vín s dlouhým potenciálem zrání v láhvi. Dochází ke snížení aroma až k jeho fádnosti. V průběhu karbonické macerace může dojít rovněž k JMK, čímž se získá mikrobiálně stabilní víno.[1] Toto víno je bohaté na aromatické látky a kyselina jablečná je v něm odbourána rozkladem, který probíhal bez účasti mléčných bakterií. Často se takové víno využívá pro zlepšování kvality různých cuvée nebo se vyškolí jako originální víno, zvláštního typu.[4]

Semikarbonická macerace

Upravený způsob karbonické macerace běžně označovaný jako semikarbonická macerace se používá v oblasti Beaujolais k výrobě vína primárního typu (s primárními aromatickými

látkami), *Beaujolais nouveau*. Úprava technologie spočívá hlavně v tom, že se sice kvasí celé hrozny, ale mírně narušené. Celých bobulí v nichž probíhají anaerobní procesy, je podstatně méně. Oba podíly (samotok i lisovaný ze rmutu) se spojují. Taková vína jsou určena k rychlému vypití.

Semikarbonickou macerací u nás používá několik vinařství při zpracování odrůdy Modrý Portugal a svoje mladá vína prodávají pod ochranou známkou „*Svatomartinské*“.[4]

Metoda přes čtyři

Uvádí se, že tento způsob získávání červených vín byl znám již ve starém Řecku. Dnes je ojediněle používán ve Francii.

Metoda spočívá v přidání vína staršího ročníku nebo vína mladého k odzrněnému rmutu modrých hroznů. Přídavek musí být dostatečně velký, aby se ještě před kvašením zvýšil obsah alkoholu na 4-5 % objemových v celém objemu rmutu. Tím se docílí odumření divokých (apikulátních) kvasinek a řady dalších nežádoucích mikroorganismů. Zvýšením obsahu alkoholu se rovněž urychlí rozpouštění červených barviv a „sladkých“ tříslovin ze slupek bobulí modrých hroznů.

Pokud se ke zvýšení obsahu alkoholu použije mladé, ještě dokvášející víno, rmut se zároveň zakvasí velkým množstvím živých kvasinek, což nakvašování rychle nastartuje a doba nakvašování se tak zkrátí. Metoda známá také pod označením Super 4 nebo *Superquatre* je vhodná pro vína určená k rychlé spotřebě. [4]

2 JABLEČNO-MLÉČNÉ KVAŠENÍ

Výroba vína je komplex procesů zajišťovaný mimo jiné kvasinkami a bakteriemi. Ty se přirozeně vyskytují na povrchu hroznů, ale můžeme je také najít v sudech, tancích a na vybavení které se používá během vinifikace, případně mohou být během výroby vína uměle přidávány.[7]

Na základě metabolické aktivity mléčných bakterií může ve víně probíhat také jablečno-mléčné kvašení, neboli malolaktická fermentace (JMK).[1] Jedná se o biologické odbourávání kyselin, při němž se působením bakterií, mění kvalitativní i kvantitativní poměry nižších organických kyselin ve víně. Chuťově méně příznivé kyseliny jablečná, citronová a další se přeměňují na kyselinu mléčnou a další produkty, které poskytují vínu jemnější chuť a zlepšují jeho stabilitu.[2]

Nejdůležitější reakcí JMK, je odbourávání kyseliny jablečné.[7] Jelikož je způsobováno bakteriemi, nejedná se o skutečné kvašení – fermentaci.[1] JMK ve víně je způsobeno enzymatickou přeměnou kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou jako sekundární proces, který obvykle následuje po etanolovém kvašení, ale může také probíhat souběžně s ním. Redukce kyseliny jablečné na mléčnou je tedy enzymatická reakce způsobená mléčnými bakteriemi v průběhu jejich exponenciálního růstu.[7]

Enzymy fungují ve dvou funkčních krocích. První, kde kyselina jablečná je dekarboxylována na pyrohroznovou kyselinu a ta je následně redukována na kyselinu mléčnou.[8]

Tato přeměna má dva efekty. Na jedné straně dojde ke snížení kyselosti vína a na straně druhé, dojde k nárůstu pH.[7]

JMK je převážně způsobeno bakteriemi rodu *Oenococcus*, konkrétně druh *O. Oeni*. Tyto bakterie snášejí nízké pH (<3,5), vyšší koncentrace etanolu (> 10 vol.%) a vyšší obsah SO₂ (50 mg/l). Rody *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Pediococcus* mohou rovněž přispívat k rozvoji JMK, obzvláště překročí-li pH vína 3,5. Nejvýznamnější efekt JMK je snížení kyselosti vína hlavně u těch vín, která jsou pěstována v chladnějších klimatických podmínkách. Mléčné bakterie svou metabolickou činností a jejími produkty, přispívají k barvě vína, celkovému aroma a současně zlepšují jeho mikrobiologickou stabilitu.

Bohužel hrozí, že při nekontrolovaném JMK dojde ke znehodnocení vína, a to složkami, které mohou změnit barvu vína. Také může dojít ke vzniku kyseliny octové, těkavých fenolů a pachu myšiny, případně mohou vznikat látky nebezpečné pro zdraví člověka

(etylkarbamát a biogenní aminy). [7] Dobře provedené JMK má velmi pozitivní vliv na budoucí mikrobiologickou stabilitu vína.[1]

2.1 Kultury JMK

Mléčné bakterie z hroznů, moštu nebo vína se řadí mezi dvě čeledi zastoupené třemi rody. Čeleď *Lactobacillaceae* je zastoupena rodem *Lactobacillus*. [7] Jedná se o grampozitivní, fakultativně anaerobní nebo mikroaerobní nepohyblivé tyčinky. [10] Další čeleď je čeleď *Streptococaceae*, kam se řadí rody *Oenococcus* a *Pediococcus*. [7] Rod *Oenococcus* jsou grampozitivní koky tvořící páry i řetězky, jsou fakultativně anaerobní a heterofermentativní. Rod *Pediococcus* jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní koky, kokovité buňky v párech nebo jako sarcíny, jsou homofermentativní – hlavním metabolitem při fermentaci sacharidů je racemická (DL) a pravotočivá L(+) kyselina mléčná. [10]

Oenococcus oeni je nejvíce zastoupeným druhem heterofermentativního kvašení. *O. oeni* je nejčastěji vyskytujícím se druhem mléčných bakterií ve víně a běžně je jediným druhem způsobující JMK ve vínech s nízkým pH ($\leq 3,5$). Méně žádoucí mikroorganismy jsou obecně zástupci rodů *Lactobacillus* a *Pediococcus*. [8]

Ačkoli jsou bakterie klasifikovány přednostně na základě metabolismu cukrů, není jasné zda pro růst těchto bakterií je obsah cukrů ve víně důležitý. Avšak cukry nejsou nezbytné pro metabolické pochody ve víně. Občas během JMK dochází ke zvýšení koncentrace glukosy a fruktosy. Toto zvýšení zřejmě ale nesouvisí s JMK, jelikož k němu dochází i bez malolaktické fermentace. Bakterie mléčného kvašení (BMK) se dále rozlišují podle jejich omezené biosyntetické schopnosti. Vyžadují komplexní řadu živin, včetně vitamínu skupiny B, purinových a pyrimidinových bází a několika různých aminokyselin. To svědčí o jejich omezené syntetické schopnosti, nejsou schopny produkovat hemové bílkoviny. [8]

2.1.1 Použití čistých kultur

JMK může probíhat na základě činnosti mléčných bakterií, které se vyskytují spontánně na hroznech ve vinici nebo ve vinařském provozu. Z pohledu kontroly celého technologického procesu JMK je však výhodnější inokulace čistou kulturou mléčných bakterií *Oenococcus oeni*. [1]

Použití čisté bakteriální kultury umožňuje výrobcům načasovat JMK a částečně ovlivnit i délku odbourávání kyseliny jablečné. Selektované bakterie navíc mají většinou pozitivní vliv na aromatický a chuťový projev vína. [1]

Toto načasování je přitom velmi důležité. Jeho průběh se doporučuje zařadit po ukončení alkoholového kvašení, kdy se vinaři vyhnou nadměrné produkci kyseliny octové a kyseliny D-mléčné. Ty mohou negativně ovlivnit aroma a chuť vína. [1]

Vyšší úroveň počáteční inokulace mléčných bakterií urychluje začátek a zkracuje JMK. Vede také k nižší tvorbě diacetylu.[9] Inokulovaná populace by proto měla představovat 10^6 KTJ/ml (KTJ – kolonie tvořící jednotku). Nízká úroveň inokulace (2×10^4 KTJ/ml) má prodlouženou „lag fázi“ až na dobu 14 dnů a vytváří vyšší obsah diacetylu, který může negativně ovlivňovat senzory kvalitu vína. Příprava inokulace bakterií v plné dávce a dle návodu výrobce je proto důležitá.[9]

Dalším způsobem aplikace mléčných bakterií je vzájemná inokulace čistých selektovaných kvasinek a mléčných bakterií. Při tomto kroku dochází rovněž k přeměně kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou, při současném zachování ovocného charakteru vína. Společná inokulace kvasinek a bakterií umožňuje mléčným bakteriím dobře se přizpůsobit zvyšujícímu se obsahu alkoholu.[1]

Alexandre a spol. (2004) se zabývali interakcí mezi *Saccharomyces cerevisiae* a *Oenococcus oeni* a bylo dokázáno, že kvasinky mohou stimulovat či inhibovat JMK.[7] Kmen kvasinek, který má vysoké požadavky na výživu během kvašení, potřebuje před začátkem JMK nutně dodat výživu, která zabezpečí dobrý rozvoj bakterií. V moštích s nedostatečným obsahem živin mohou některé kmeny kvasinek vytvářet vyšší obsah SO_2 , který může následně brzdit rozvoj mléčných bakterií.[9] Osborne a Edward (2007) zjistili, že některé kmeny *S. cerevisiae* mohou produkovat peptid zodpovědný za inhibici JMK. Úspěšná společná inokulace závisí na vhodně vybrané kombinaci kvasinek a bakterií.[7]

Pokud jsou vytvořeny optimální podmínky, umožní společná inokulace rychlejší průběh JMK, takže vína získávají méně „mléčného“ a „jogurtového“ charakteru a zachovávají si výraznější chuťovou a aromatickou svěžest.[1]

V současnosti jsou různé startovací kultury pro JMK uzpůsobeny v komerční podobě jako lyofilizované preparáty. Avšak vitalita těchto starterových kultur, může být snížena po zaočkování do vína. Výhodnější pro buněčnou vitalitu je použití čerstvých či pouze zmrazených preparátů. Ovšem tyto roztoky, nejsou vhodné pro dávkování do velkých objemů. Použití starterových kultur se smíšenou mikrobiální populací poskytuje inokulum téměř nepoužitelné. Na druhou stranu, ačkoli nízká buněčná aktivita negativně ovlivňuje výsledek inokulace, vysoká vitalita nezaručí úspěch JMK. Různé chování bakterií ve víně ukazuje na různé bakteriální kmeny, které odrážejí jejich rozdílné schopnosti přizpůsobit

se a na různou malolaktickou aktivitu ve víně. Zatím co jeden kmen bakterií není schopný za určitých limitujících chemicko-fyzikálních podmínek se adaptovat, jiný kmen za stejných podmínek se adaptuje a dochází k jeho pomnožení.[7]

2.2 Podmínky JMK

Na vlastní proces JMK má vliv několik faktorů:

Hodnota pH – je jedním z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují průběh JMK. Obvyklá hodnota je v rozmezí 3,0 – 3,6 pH. Čím vyšší je hodnota pH moštu nebo vína, tím snadněji dochází k rozmnožování mléčných bakterií a k rychlejšímu průběhu JMK.[1] Zvýšení hodnoty pH u moštů způsobí, že takové mošty a vína jsou potom náchylnější na růst divokých mléčných bakterií. Nízká hodnota pH brzdí naopak růst a vývoj *O. oeni*. Jestliže je hodnota vysoká, dochází k rozvoji bakterií *Pediococcus* a *Lactobacillus* nebo také k rozvoji kvasinek *Brettanomyces*. Ve vínech s hodnotou pH < 3,5 jsou dominantní kmeny bakterie *Oenococcus oeni*. Ve vínech s hodnotou pH > 3,5 se mohou častěji vyskytovat bakterie rodů *Pediococcus* a *Lactobacillus* a mohou se stát dominantními. Neřízená JMF, zejména při hodnotách pH > 3,5 může vytvářet negativní senzorycké vlastnosti, jako jsou mléčné a jogurtové aroma, hořké tóny v dochuti vína, animální a octové tóny. U vín s nízkým obsahem kyselin a hodnotou pH > 3,5 může také díky aktivitě bakterií *Pediococcus* a *Lactobacillus* dojít k odbourávání kyseliny vinné za vzniku kyseliny mléčné, kyseliny octové a CO₂. [9]

Obsah oxidu siřičitého (SO₂) – velmi dobře eliminuje populaci všech bakterií. Významný je obsah volného SO₂. Vázaný SO₂ má výrazně nižší antimikrobiální působení než volný SO₂. Slabé síření moštu většinou nemá negativní vliv na proběhnutí JMK, protože v průběhu alkoholového kvašení se obsah volného SO₂ zpravidla snižuje a většina mladých vín nemá větší obsah než 25 – 40 mg/l celkového SO₂. Aplikace SO₂ do mladých vín může naproti tomu velmi negativně ovlivnit nástup a průběh JMK. V takovém případě může i aplikace SO₂ v množství 20 mg/l působit negativně.[1]

V moštech s nedostatečným obsahem živin mohou některé kmeny kvasinek vytvářet vyšší obsah SO₂, který může následně brzdit rozvoj mléčných bakterií. Rauhut aj. (2004) v této souvislosti uvádí, že přidavek cysteinu a glutathionu po ukončení alkoholového kvašení přispívá ke stimulaci růstu mléčných bakterií.[9]

Teplota – teplotní optimum pro JMK leží mezi 22 – 25 °C. Ke spontánnímu nástupu a průběhu JMK většinou nedochází při teplotách pod 10 °C.[1]

Autolitická aktivita kvasinek na konci alkoholového kvašení upravuje koncentraci aminokyselin, peptidů a bílkovin ve víně. Při autolýze se uvolňují glukany a mannoproteiny. Mannoproteiny mohou stimulovat růst bakterií dvěma způsoby. Buď tím, že poutají některé nežádoucí mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem a tím zbavují víno látek, které jsou pro mléčné bakterie toxické, nebo dodávají živiny díky enzymatické hydrolýze. Ponechání kvasničných kalů ve víně po vykvašení proto může být pro nástup JMK pozitivní. Nehledě na skutečnost, že kvasničné kaly vytvářejí reduktivní prostředí a brání tím oxidaci vína, neboť z důvodů aktivace JMK není možné aplikovat SO₂. [9]

Optimální podmínky pro JMK lze shrnout: teplota alespoň 18 °C, minimální aplikace oxidu siřičitého, úprava pH pomocí chemického odkyselení, delší ponechání vína na kvasnicích a vyšší podíl kalových částic, aplikace čisté bakteriální kultury.[1]

2.3 Metabolismus fenolických složek

Studium interakcí mezi fenolickými látkami a BMK ve víně se odvíjí od metabolismu hydroxyskořicové kyseliny různými rody bakterií vyplývající ze složení těkavých fenolů. Deriváty určitých fenolů mají podstatný vliv na aroma vína, proto jsou považovány za zdroj fenolové off-flavours vína, díky jejich charakteristické vůni a nízkému prahu detekce. Ve víně je množství těchto látek celkem nízké a jsou obvykle limitovány koncentrací jejich prekurzorů. Hernández a kol. (2006) ukázali, že kyselina *trans*-kaftarová a kyselina *trans*-koutarová jsou substráty pro BMK u nichž se projeví aktivita skořicové esterasy zvýšením koncentrace hydroxyskořicové kyseliny. Dalším zdrojem kávové a *p*-kumarové kyseliny mohou být hydrolyzáty cinnamoyl-glukosid antokyanů, stejně jako další deriváty kyseliny hydroxyskořicové vzniklé činností enzymů BMK.

Dále se ukázalo, že mezi vinnými BMK je jistá závislost. Ta může být kmenová nebo může záviset na isomerní formě výše zmíněných esterů, protože pouze *trans*-isomery se účastnili daných reakcí. Kromě BMK mohou být volné fenolické kyseliny metabolizovány i jinými mikroorganismy, hlavně *Brettanomyces/Dekkera* na 4-vinyl deriváty, které mohou být dále redukovány na 4-ethyl deriváty. Proto na základě těchto pozorování lze říci, že BMK mohou přispět k rozdílům v úrovních vinylfenolů. [7]

3 PŘÍRODNÍ ANTIOXIDANTY

Rostliny obsahují různorodou skupinu složek s antioxidačními vlastnostmi, které jsou zastoupeny ve formě vitaminů (C, E, A), minerálních látek (měď, železo, selen) a dalších složek běžné stravy. Získáváme je potravou, hlavně z ovoce, zeleniny, obilovin a nápojů [11].

Mezi přirozeně se vyskytující antioxidanty patří rostlinná barviva (flavonoidy), nejrozličnější fenolické látky, tokoferoly, fosfolipidy, lignany, diterpeny, kurkuminoidy, taniny a mnoho dalších látek. Tyto látky jsou obsaženy ve větším či menším množství především v rostlinných materiálech, z nichž mohou být také extrahovány.[12] Antioxidanty zachytávají volné radikály dříve, než mohou škodit a brání tak rozšíření oxidačního poškození.[14] Z hlediska chemické podstaty jsou antioxidanty velmi různorodou skupinou a proto se liší i chemická podstata jejich antioxidačního působení (reakcí s radikály přerušují řetězovou radikálovou reakci, váží do komplexů katalyticky působící kovy, reakcí s kyslíkem snižují jeho množství aj.).[12,13]

Bylo zjištěno, že antioxidanty zpomalují, blokují nebo zabraňují oxidačním změnám látek v lidském těle a v buňkách. Obsah antioxidantů v potravinách zpomaluje ve značné míře aterosklerotické procesy, inhibuje akumulaci cholesterolu v krevním séru a zvyšuje rezistenci cévních stěn proti jejich lámavosti. Mnohé antioxidanty snižují riziko onemocnění koronárních cév tím, že zachycují a neutralizují volné radikály. Zelenina, ovoce a zemědělské plodiny představují v lidské výživě významný zdroj antioxidantů, jak při přímé konzumaci, tak i ve formě zeleninových a ovocných šťáv. *Justesen a spol.* odhadl denní příjem flavonoidů na 26 mg na osobu.[14]

3.1 Antioxidanty vína

Množství a zastoupení fenolických látek ve víně a mošttech má velký význam pro kontrolu oxidačních reakcí v lidském těle. Fenolické látky, obzvláště flavanoly, mají antioxidační vlastnosti, které přispívají ke zlepšení zdravotního stavu. Víno obsahuje širokou škálu polyfenolických látek, které mají proti-rakovinové a protizánětlivé účinky *in vitro*, ale také dokáží zabránit buněčnému bujení, které může vyvolat aterosklerosu a koronární srdeční onemocnění (CHD). Ve Francii je úmrtnost na CHD daleko nižší než v jiných vyspělých zemích, ačkoli dietetický příjem nasycených kyselin je vysoký. Mírná konzumace červeného vína je zřejmě zodpovědná za tuto skutečnost známou jako „*Francouzský paradox*“[25]

Antioxidační vlastnosti flavonoidů jsou dvojího typu, a to že přímo zhasí volné radikály nebo přerušují řetězovou reakci či opravují jiné antioxidanty jako je např. α -tokoferol tím, že jim předávají vodíkový atom. Aplikace katechinů na krysy ukázala snížení akumulace lipidových peroxidů v plasmě a významný úbytek spotřeby α -tokoferolu.[30]

Fenoly jsou velkou a komplexní skupinou složenou z různých jednotek, které se podílejí na kvalitě červených vín. Jsou také významné u bílých vín, ale vyskytují se zde pouze v malých koncentracích. Fenoly a jim příbuzné látky mohou ovlivňovat vzhled, chuť, aroma, vůni a antimikrobiální vlastnosti vína. Mohou pocházet z ovoce (slupka, dužnina, semeno) a třapiny, mohou být také produktem kvašení, nebo mohou být vyextrahovány z dřevěných sudů, ve kterých je víno uloženo. Jejich obsah ovlivňují především pěstitelské podmínky, mezi něž lze řadit nejen klimatické a půdní vlastnosti stanoviště, ale i agrotechnické zásahy používané na vinici.[8]

Složení fenolických látek ve vyrobeném víně závisí jak na kvalitě hroznů, tak na použitém způsobu vinifikace, zejména na podmínkách macerace. U modrých odrůd révy vinné obsahuje 30 – 40 % všech fenolických látek slupka a 60 -70 % semena.[8]

Během výroby vína můžeme pozorovat změny ve složení fenolů při drcení hroznů, vlastní fermentaci, MLF, při zrání v sudech či v lahvích.[15]

3.2 Polyfenoly

Rostlinné polyfenoly jsou amorfni látky fenolické povahy, které jsou rozšířeny v nejrůznějších částech rostlin – v kůře, dřevě, listech, plodech, kořenech i v patologických útvech. Uplatňují se při srážení roztoků želatiny a alkaloidů, se železitymi solemi dávají tmavé sraženiny, oxidují se v alkalickém prostředí atd. Jsou v rostlinné říši všudypřítomné, dodávají rostlinám charakteristické zbarvení, chuť plodům, ale často jsou smyslově nevýrazné.[16]

Polyfenolické sloučeniny, zvl. flavonoidy, jsou účinnými antioxidanty díky své schopnosti zachytávat volné radikály mastných kyselin a reaktivní formy kyslíku. [14]

Předpokládá se, že na protektivním účinku se podílí schopnost rostlinných polyfenolů zhaset reaktivní kyslíkové radikály a omezovat jejich tvorbu chelatací iontů přechodných kovů, především kationtů železa, které jsou schopny generovat vysoce reaktivní hydroxylové radikály. Polyfenoly chrání lipoproteiny o nízké hustotě před oxidační modifikací, která je považována za jeden z klíčových dějů při rozvoji aterosklerosy. Mohou také působit proti vzniku krevních sraženin a tímto způsobem snižovat riziko infarktu

myokardu nebo mozkové mrtvice. Byla navržena řada mechanismů, kterými mohou polyfenoly přítomné v potravě člověka chránit před vznikem rakoviny. Zahrnují řadu účinků na úrovni přenosu signálů, které se uplatňují při kontrole buněčného cyklu, apoptózy a angiogenesy. Mohou se uplatnit také antiestrogenní účinky některých tříd polyfenolů, především isoflavonů, lignanů a stilbenů.[17]

Několik tisíc molekul mající polyfenolickou strukturu (několik hydroxylových skupin na aromatickém kruhu), můžeme najít zejména u vyšších rostlin. Tyto látky jsou sekundárně metabolizovány rostlinami a zpravidla se účastní ochrany rostliny před UV zářením či patogeny. Polyfenoly můžeme rozdělit do několika skupin v závislosti na počtu aromatických kruhů a dalších skupin, které jsou na ně navázány. Dělíme je pak na [18]:

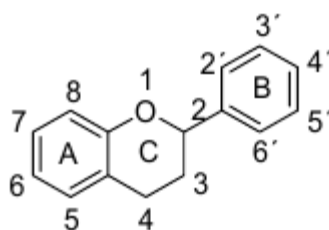
- ◆ fenolové kyseliny
- ◆ flavonoidy
- ◆ stilbeny
- ◆ lignany

Fenolické látky jsou důležité složky vína, jež ovlivňují jeho organoleptické vlastnosti. Jedná se hlavně o barvu, svíravost a jeho aroma.[15]

Celkový obsah fenolických látek v konečném stádiu výroby červeného vína může dosáhnout i 3500 mg/l se zastoupením hlavních fenolických skupin: fenolové kyseliny (hydroxybenzoové a hydroxyskořicové kyseliny jako jsou kyselina gallová a kumarová); stilbeny (např. trans-resveratrol); flavanoly (např. myricetin, quercetin a keampferol); flavonoly (např. katechin a epikatechin); anthokyaniny (např. malvidin-3-glukosid); a proanthocyanidiny nebo kondenzované taniny (např. epikatechin-katechin dimer nebo prokyanidin B1).[15]

3.2.1 Flavonoidy

Flavonoidní látky neboli flavonoidy jsou velmi rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů [6]. V současné době je známo více než 6000 flavonoidních látek a stále se nacházejí další sloučeniny [21]. Jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu, tvořeného dvěma benzenovými kruhy spojenými heterocyklickým pyranem. Běžně bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxy skupinami nebo metoxy skupinami a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace.[20]



Obr. 1: Flavan[19]

Flavonoidy můžeme pak rozdělit na 6 podskupin [18], a ačkoli obsahují hydroxylovou skupinu nemají vlastnosti jako alkoholy [20]:

- ◆ flavonoly,
- ◆ flavony,
- ◆ isoflavony,
- ◆ flavanony,
- ◆ anthokyanidiny
- ◆ flavanoly (katechin a proanthokyanidin).

Kromě toho mohou být polyfenoly navázány na různé sacharidy či organické kyseliny.[18]

Jejich základní strukturu tvoří flavanové jádro a nebo 2-fenyl-benzo- γ -pyran. Tato struktura je charakteristická pro 3-deoxyflavonoidy (flavony, flavanony, izoflavony a neoflavony) a 3-hydroxyflavonoidy (flavonoly, anthokyaniny, flavan-3,4-dioly, a flavan-3-oly). Flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě glykosidů, díky čemuž jsou lépe rozpustné v běžných fyziologických podmínkách rostlinné buňky a zároveň snižuje jejich reaktivitu a zabezpečuje lepší stabilitu. Navíc, glykosidy flavonoidů nejsou substrátem pro polyfenoloxidasu a tedy nepodléhají tzv. enzymovému hnědnutí. [19]

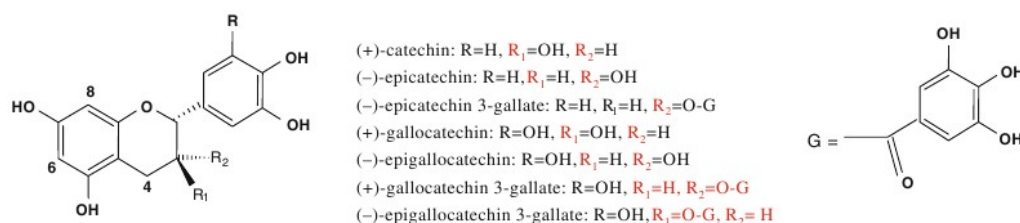
Nejběžnějšími flavonoidy vína jsou flavanol, katechin (flavan-3-ol) a antokyanin (červené víno). V menším množství je přítomen flavan-3,4-diol (leukoantokyanin). Flavonoidy se vyskytují volně nebo jako polymery s dalšími flavonoidy, sacharidy, fenoly nebo v kombinaci s výše zmíněným. Flavonoidy jsou z velké části syntetizovány v endoplazmatickém retikulu a následně uloženy ve střední vakuole rostlinné buňky. Předpokládá se, že jejich funkcí v hroznech révy vinné, stejně jako u jiných rostlin, je obrana před mikroorganismy, hmyzem a býložravci.[8]

Díky podobným chemickým vlastnostem jsou flavanoly těžce separovatelné. Nicméně, díky tomu, že HPLC poskytuje různé retenční časy, je možná identifikace těchto sloučenin. [25]

Katechin

Hlavním zástupcem flavan-3-olu v hroznech jsou (+)-katechin a jeho isomer (-)-epikatechin a méně často pak gallový ester (-)-epikatechinu, (-)-epikatechin 3-gallát. Gallokatechiny můžeme najít v odrůdách révy vinné (*Vitis vinifera*), zatímco katechin-3-gallát a gallokatechin-3-gallát byly nalezeny v některých odrůdách non-*Vinifera*. [7, 38]

Flavanolové (flavan-3-ol) oligomery a polymery se nazývají kondenzované taniny nebo proanthokyanidiny. Jejich název, taniny, vyjadřuje jejich schopnost interakce s proteiny a vysrážet je. [7]



Obr. 2: Struktura flavanolových monomerů [7]

Ve víně jsou flavan-3-oly jednou z majoritních skupin flavonoidů. Můžeme je najít ve slupce a semenech, ze kterých jsou pak extrahovány do moštu během vinifikace. Tyto látky jsou obzvláště důležité pro charakter vína (svíravost a trpkost), který závisí na struktuře a stupni polymerizace. Mimo to bylo zjištěno, že proanthokyanidiny mají vysokou antioxidační kapacitu (*in vitro* a *in vivo*). Monomery katechinů, včetně katechinu samotného, epikatechinu, gallokatechinu a gallátových esterů, přispěly ke zvýšení antioxidační kapacity plasmy a rezistence LDL cholesterolu před oxidací. [38]

(+)-Katechin a (-)-katechin jsou flavonoidy, které se hojně vyskytují v přírodním materiálu nebo bylinách využívaných v léčitelství. Katechiny, obzvláště (-)-epikatechin (EC), (-)-epikatechin-3-gallat (ECg), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epigallocatechin-3-gallat (EGCG), (+)-katechin a (+)-gallocatechin byly shledány, že mají antioxidační, protirakovinné, antiangiogenní, antimutagenní, hypocholesterogenní, protidiabetické, antibakteriální, proti HIV a protizánětlivé účinky. (+)-Katechin také vykazuje prevenci před rakovinou a má neuroprotektivní účinky. (-)-Epikatechin inhibuje glukuronizaci a podporuje vstřebávání léků ve střevech. [37]

Rutin

Rutin (quercetin-3-rutinosid), někdy nazývaný vitamin P, je nejčastěji se vyskytující glykosidickou formou quercetinu.[22] Poprvé byl objeven v pohance v 19 stol. Jedná se o nízkomolekulární polyfenolickou látku široce zastoupenou v ovoci i zelenině. Pohanka je však jeho hlavním zdrojem.[26] Tato látka je vyššími rostlinami syntetizována jako obrana vůči ultrafialovému záření a chorobám. Rutin jako sekundární metabolit rostlin se používá k léčení zvýšené lomivosti a propustnosti krevních vlásečnic způsobených různými chorobami, má také antivirové a antihypertenzní vlastnosti.[22, 26] Velmi významná je také jeho antioxidační účinnost tj. schopnost působit proti volným radikálům. Z chemického hlediska se jedná o diglukosid polyfenolu quercetinu.[22]

Quercetin

Quercetin se v rostlinách vyskytuje hlavně jako glykosid, jako je rutin (quercetin-3-rutinosid) a quercitrin atd. Před několika lety se quercetin a rutin stali centrem zájmu díky jejich schopnosti vychytávání volných radikálů, jejich příznivému účinku na poškozenou DNA a jejich fyziologickému efektu.[36]

3.2.2 Stilbeny

Stilbeny jsou rozeznány jako biologicky aktivní látky, které vykazují protifungicidní aktivitu. Nejčastěji popsáným antimikrobiálním efektem resveratrolu a dalších stilbenů je působení proti nejčastějšímu patogenu, který napadá hrozny révy vinné, *Botrytis cinerea*, který je příčinou značných ztrát ve vinicích po celém světě.[29]

Stilbeny jsou podskupinou fenolických látek přirozeně se vyskytující v druzích rostlin, ale hrozny a víno jsou považovány za nejdůležitější zdroj těchto látek. Stilbeny mohou být syntetizovány v révě vinné jako ochrana při reakci na stres, proti mikrobiální infekci a UV záření. Během výroby vína jsou uvolněny v moštu a následně i ve víně. Díky jejich antioxidačnímu, antikarcinogennímu a antimutagennímu účinku, mají stilbeny velký význam v lidské výživě.[7]

Stilbenoidy jsou odvozeny od kyseliny skořicové a tří acetátových jednotek z malonyl koenzymu A. První část biosyntézy je společná i pro flavonoidy. Další dvě dráhy se rozdělují v bodě cyklizace styryl-3,5,7-triketoheptanové kyseliny. C-acylací vzniká chalkon a následnou modifikací vzniká flavonoid. Aldolovou kondenzací téhož meziprojektu polyketidu se vytváří stilben-2-karboxylová kyselina, která je nestabilní a vzniká tak řada struktur známých jako stilbenoidy.[7]

Koncentrace stilbenů ve víně závisí na mnoha faktorech. Kromě klimatických podmínek a odrůd révy vinné jsou to také UV záření, plísňové onemocnění, obsah iontů těžkých kovů a enologické metody. Jejich obsah je také ovlivněn enzymatickou aktivitou kvasinek, a to druhy které produkují isomerasy a glukosidasy. Rovněž bakterie mléčného kvašení zodpovědné za MLF ve víně, mohou mít vliv na koncentraci stilbenů. Naopak stárnutí vína, jak se ukázalo nemá žádný vliv na obsah stilbenů.[7]

Resveratrol (RV)

Jedním z nejvíce zkoumaných stilbenů je *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilben), fytoalexin produkovaný hrozny jako odpověď na plísňové onemocnění, zejména při napadení plísní rodu *Botrytis cinerea*. Syntéza resveratrolu v hroznech probíhá zejména v buňkách slupky a je nulová nebo jen velmi nízká v dužnině.[7]

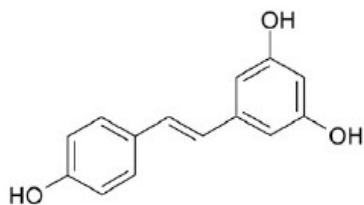
Zájem o sledování resveratrolu byl podmíněn existencí tzv. „francouzského paradoxu“. Bylo zjištěno a statisticky dokázáno, že v určitých částech Francie byla nižší úmrtnost na onemocnění koronárních tepen (infarktu myokardu), a to navzdory tomu, že spotřeba tuků byla vysoká. Konzumace vína byla jedním z faktorů, kterým bylo možno vysvětlit nízkou úmrtnost na onemocnění věnčitých tepen.[23] Fenolické látky červeného vína vykazují antioxidační aktivitu a prevenci před oxidací LDL cholesterolu. Epidemiologické studie zaznamenaly, při mírné konzumaci vína, snížení rizika ischemického srdečního onemocnění. Je prokázáno, že RV je účinným inhibitorem oxidace polynenasycených mastných kyselin (PUFA), které jsou součástí LDL cholesterolu.[27]

V současné době řada pracovišť testuje biologické vlastnosti resveratrolu od antioxidačních vlastností a vlivu na aterosklerosu a kardiovaskulární choroby, až po antimutagenní efekt a chemoprevenci nádorových onemocnění. [23]

RV byl poprvé izolován v roce 1940 z kořene čemeřice bílé (*Veratum grandiflorum O. Loes*).[27] Komplexní poznatky o resveratrolu byly získány v osmdesátých letech minulého století, kdy přístrojové vybavení (zejména HPLC) umožnilo sledování jeho výskytu a koncentrace ve vinné révě. V řadě studií bylo prokázáno, že resveratrol jakožto polyfenol přírodního původu, je biologicky aktivní, má významné antioxidační vlastnosti a pohlcuje volné radikály.[23]

Resveratrol je svou strukturou 3,4',5-trihydroxystilben. Díky jeho struktuře mohou existovat dva isomery *cis*- a *trans*-. V rostlinném materiálu se obvykle vyskytuje směs obou isomerů, většinou ale převažuje *trans*- isomer. Resveratrol se vyskytuje rovněž ve formě glukosidů, β-glukosyloxy skupina je vázána buď na uhlík C-3(piceid), nebo v poloze

C-4'(resveratrolosid). Kromě toho můžeme v rostlinném materiálu najít oligomery resveratrolu, tzv. konstitutivní stilbeny, dimer resveratrolu ϵ -viniferin a trimer α -viniferin. [23, 24]



Obr. 3: Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilben)

Resveratrol lze zařadit mezi fytoalexiny, což jsou sekundární metabolity rostlin, které se začínou tvořit *de novo* nebo ve zvýšené míře jako odpověď na stres (mechanické poškození, UV záření, ozon) nebo po napadení rostliny nepatogenními nebo avirulentními bakteriemi, viry či houbami.[23] Avšak je rovněž produkován po chemickém ošetření fungicidy a herbicidy.[28]

Při vinifikaci červeného vína zejména při jeho maceraci se slupkami a semeny a během fermentace, vzrůstá obsah resveratrolu. Obsah a syntéza resveratrolu je také ovlivněna odrůdou révy vinné, která může být geneticky kontrolována.[28]

Přestože víno je hlavním zdrojem resveratrolu, je málo informací o absorpci, distribuci a metabolismu *trans*-resveratrolu v lidském a zvířecím těle.[28]

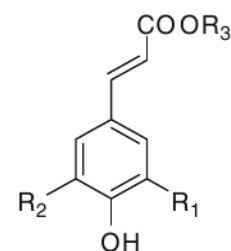
3.2.3 Fenolové kyseliny (hydroxy kyseliny)

Kyselina hydroxyskořicová (HCA) a její deriváty

Hydroxyskořicové kyseliny mají C6-C3 kruh, formálně patří do skupiny fenylypropanoidů. Mezi HCA, které můžeme najít ve víně, patří kyselina kávová, *p*-kumarová, ferulová a sinapová kyselina. Tyto látky se vyskytují v *cis*- a *trans*- konfiguraci, kde *trans* formy jsou více stabilní a proto i více převažují. HCA se ve víně vyskytují v menším množství v jejich volné formě, zatímco depsidy, jako jsou estery l-(+)-vinné kyseliny, převažují.[7]

Mezi hydroxyskořicovými kyselinami převažuje kyselina kaftarová. Tvoří až 50% z celkového množství HCA. Další důležité látky jsou estery kyseliny vinné, *p*-kumarové a ferulové a *trans-p*-kumarový glykosid. Obsah HCA ve víně závisí na mnoha faktorech. Jednak je to odrůda vína, pěstitelské podmínky, klimatické podmínky atd. Není proto překvapující, že v získaných výsledcích od různých autorů jsou značné rozdíly. Obvykle se

koncentrace pohybuje okolo 100 mg/l. Zatím co šťávy a mladá vína obsahují malé množství volných hydroxyskořicových kyselin, během skladování dochází k jejich nárůstu. [7]



Obr. 4: Hydroxyskořicová kyselina

Tab. 1: Struktury hydroxyskořicové kyseliny ve víně [7]

Hydroxyskořicové kyseliny	R ₁	R ₂	R ₃	MW
Kyselina hydroxyskořicová	H	H	H	148
Kyselina kávová	OH	H	H	180
Kyselina kaftarová	OH	H	Kyselina vinná	312
Kyselina <i>p</i> -kumarová	H	H	H	164
Kyselina <i>p</i> -koutarová	H	H	Kyselina vinná	296
Kyselina ferulová	OCH ₃	H	H	194
Kyselina fertarová	OCH ₃	H	Kyselina vinná	326
Kyselina sinapová	OCH ₃	OCH ₃	H	224

Kyselina ferulová

Kyselina ferulová (4-hydroxy-3-methoxyskořicová kyselina) (FA) patří mezi fenolické látky, které můžeme najít téměř v každém rostlinném pletivu, díky čemuž tvoří podstatnou bioaktivní součást mnoha potravin.[32] FA vzniká v metabolismu fenylalaninu a tyrosinu. [31]

Poprvé byla izolována z komerční pryskyřice v 1866 a chemicky syntetizována v 1925. Ovšem její biologický účinek byl objeven až v 70. letech minulého století.[32] Dnešní době se používá ke stabilizaci sádla a rostlinných olejů a potravin obsahujících tuky a oleje. [33]

Jejími bohatými zdroji jsou obilné otruby, celozrnné obilné výrobky, citrusové plody, banány, káva, pomerančový džus, lilek, bambusové výhonky, červená řepa, hlávkové zelí, špenát a brokolice.[22]

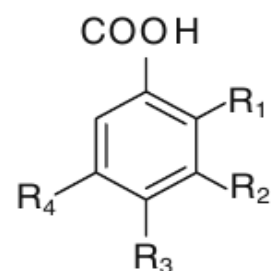
Kromě antioxidačního účinku má ferulová kyselina některé další vlastnosti, které jsou velmi prospěšné pro potravinářský průmysl (antimikrobiální a texturální vlastnosti). Protože jde o přirozenou strukturální složku rostlin, lze používat k zachování křehkosti

tepelně opracované zeleniny, ale také k zahušťování, neboť má schopnost tvořit gely a gumy. Pokud se získává ze zemědělského odpadu za přijatelnou cenu, lze kyselinu ferulovou také používat jako surovinu pro výrobu vanilinu pomocí plísňových kultur.[33]

Pohlcování UV záření kyselinou ferulovou katalyzuje stabilní fenoxo radikálovou formaci a tak zvýší její schopnost ukončit řetězovou radikálovou reakci. Podle účinného vychytávání škodlivých radikálů a potlačení radiace vyvolané oxidační reakcí, ferulová kyselina může sloužit jako důležitý antioxidant v udržení fyziologické integrity buněk vystavených kyslíku a zásahu UV záření. Podobná fotoprotekce je využívána i v kosmetických prostředcích. Rovněž řada dalších průmyslových využití kyseliny ferulové je založena na jejím antioxidačním potenciálu.[31]

Deriváty kyseliny benzoové (HBA)

HBA jsou odvozeny od benzoové kyseliny a jsou charakteristické C₆- C₁ uhlíkovým skeletem (viz obr.5). Nejznámější deriváty, které můžeme najít ve víně jsou kyselina gallová, *p*-hydroxybenzoová kyselina, kyselina syringová, salicylová a vanillová. Ve víně můžeme tyto kyseliny najít hlavně v jejich volné podobě. Množství HBA ve víně závisí na odrůdě vína a růstových podmínkách.[7]



Obr. 5: Hydroxybenzoová kyselina

Tab. 2: Struktury kyseliny hydroxybenzoové ve víně [7]

Hydroxybenzoové kyseliny	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	MW
Kyselina gallová	H	OH	OH	OH	170
Kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	H	H	OH	H	138
Kyselina protokatechová	H	OH	OH	H	154
Kyselina salicylová	OH	H	H	H	138
Kyselina syringová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	198
Kyselina vanillová	H	OCH ₃	OH	H	168

Kyselina gallová

Kyselina gallová je jednou z HBA jenž se vyskytují v největších koncentracích. Tato kyselina nepochází pouze z hroznů, ale vzniká hydrolýzou hydrolyzovaných a kondenzovaných taninů, flavan-3-ol ester kyseliny gallové.[7]

Kyselina gallová (3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina) je přirozeně se vyskytující polyfenolická látka v mnoha druzích ovoce, zeleniny a z nich vyrobených produktů (čaj, víno atd.) uplatňujících se jako antioxidant.[34,35] Tato kyselina je velmi dobře absorbována lidským tělem; ve skutečnosti se mikromolární koncentrace objevují, ať už ve volné formě nebo jako glukuronidy kyseliny gallové a jeho hlavního metabolitu 4- *O*- methylgallát, v krevní plasmě po požití potravy bohaté na tuto kyselinu.[34]

Kyselina gallová je známá jako silný antioxidant schopný zhášet volné kyslíkové radikály (ROS). Nicméně, jiné studie ukázaly cytotoxickou aktivitu. Ta je zřejmě způsobena intracelulárním Ca^{2+} a reaktivními formami jako jsou superoxid anionty, peroxid vodíku, hydroxylové radikály a chinony. Kromě toho je kyselina gallová považována jak za antioxidační tak prooxidační látku.[34]

Některé estery kyseliny gallové jsou používány jako aditiva do potravin pro preventivní oxidaci. Využívají se rovněž pro své biologické a farmatologické účinky, včetně vychytávání volných radikálů vyvolávajících apoptosu rakovinových buněk, inhibici škodlivých epoxidas přerušující signál dráhy zahrnující Ca^{2+} a ROS.[35]

4 CHROMATOGRRAFIE

Chromatografie je separační metoda, při které se oddělují – separují složky obsažené ve vzorku.[38] Všechny chromatografické separační metody jsou založeny na rovnovážné distribuci složek vzorku mezi dvě fáze, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární. Aby docházelo k výše uvedené distribuci, musí existovat fázové rozhraní mezi stacionární a mobilní fází, která unáší složky vzorku tak, aby obtékala stacionární fázi. Při dělení dochází k opakovanému vytváření rovnovážných stavů separovaných látek mezi mobilní a stacionární fází. Chromatografický systém se může natolik blížit rovnováze, že distribuci složky A mezi dvě fáze můžeme popsat distribuční (rozdělovací) konstantou K_D , což je poměr rovnovážných koncentrací této složky [A] ve dvou koexistujících fázích. Různé složky mají různé hodnoty distribučních konstant. Čím je hodnota distribuční konstanty pro danou látku vyšší, tím její molekuly setrvávají ve stacionární fázi delší dobu a tím větší je její retence. Pro dělení jednotlivých složek je tedy nutné, aby se lišily svými distribučními konstantami.[39]

Charakteristickou veličinou pro každou separovanou látku v daném systému je eluční (retenční) čas t_R nebo eluční (retenční) objem V_R . Retenční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky a retenční objem je proteklý objem kolonou za tuto dobu.[39]

4.1 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografických metod je velké množství. Proto je účelné jejich rozdělení do určitých skupin. Vzhledem ke značné různorodosti se dělí podle několika hledisek:[38]

- ◆ Podle skupenství mobilní fáze
 - ◆ Kapalinová chromatografie (*Liquid Chromatography* – LC) – mobilní fází je kapalina.
 - ◆ Plynová chromatografie (*Gas Chromatography* – GC) – mobilní fází je plyn.
- ◆ Podle uspořádání stacionární fáze
 - ◆ Kolonová chromatografie – stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně).
 - ◆ Plošné techniky:

Papírová chromatografie (*Paper Chromatography* – PC) – stacionární fáze je součástí chromatografického papíru.

Tenkvrstvá chromatografie (*Thin Layer Chromatography* -TLC) – stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladu (např. Skleněné desce nebo hliníkové fólii).

- ◆ Podle povahy děje, který převládá při separaci

Obvykle se při separaci uplatňuje několik fyzikálně-chemických dějů současně, ale jeden z nich převládá.

- ◆ Rozdělovací chromatografie – o separaci rozhoduje odlišná rozpustnost složek vzorku ve stacionární fázi (kapalina) a mobilní fázi (kapalina nebo plyn).
- ◆ Adsorpční chromatografie – o separaci rozhoduje různá schopnost složek poutat se (adsorbovat se) na povrch stacionární fáze (tuhá látka).
- ◆ Iontově-výměnná chromatografie – o separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměnič) a ionty vzorku.
- ◆ Gelová chromatografie – složky se separují podle velikosti na pórovité stacionární fázi (gelu); menší molekuly vzorku se v pórech gelu zdržují déle (molekulově síťový efekt).
- ◆ Afinitní chromatografie – stacionární fáze je schopna vázat ze vzorku právě určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah (afinitu).

V této práci byla využita metoda HPLC s UV-VIS detekcí, proto se níže budu zabývat pouze touto metodou.

4.1.1 Kapalinová chromatografie

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Na rozdíl od plynové chromatografie rozhodují o separaci složek vzorku nejen jejich interakce se stacionární fází, ale velmi výrazně i použitá mobilní fáze. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fázi. Čas, jaký stráví v jedné nebo druhé fázi, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Jsou využitelné všechny možné mechanismy separace – adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii. Podle uspořádání stacionární fáze rozlišujeme kolonovou a tenkvrstvou či papírovou kapalinovou chromatografii.[38]

Protože je možno pracovat za laboratorní teploty bez nutnosti převádět vzorek na plyn, je kapalinová chromatografie vhodná i pro separaci tepelně nestálých a netěkavých sloučenin.

[38]

Čerpadlo.

Kapalina se do kolony čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly. Dobré čerpadlo dociluje průtoku v rozsahu od mikrolitrů do desítek mililitrů za minutu s méně než 1 % kolísáním průtoku při tlaku až 35 MPa. Materiál čerpadla (nerezová ocel, keramika, plast) nesmí být narušován mobilní fází a nesmí do ní uvolňovat žádné látky. Ventily řídící tok eluentu jsou často zhotoveny z pryže nebo safíru.[38]

Dávkovací zařízení - Autosamplery HPLC

Automatická dávkovače jsou spojené se zásobníkem vzorku, ve kterém jsou umístěny mikronádobky (vialky) uzavřené pryžovým septem nebo perforovanou zátkou z polypropylenu. Existuje několik druhů konstrukčního spojení injekční stříkačky dávkovače:[39]

- ◆ Injekční stříkačka dávkovače je fixní a pohybuje se pouze zásobník vzorku pod zvednutou jehlou injekční stříkačky dávkovače, jejíž píst je ovládán speciálním krokovým motorem. Pohyb zásobníku je buď osový nebo kruhový
- ◆ Zásobník vzorků je fixní a pohybuje se raménko injekční stříkačky dávkovače ve směru osy x-y-z
- ◆ Zásobník i injekční stříkačka dávkovače jsou fixní, vialka je roboticky dopravena pod zvednutou jehlu injekční stříkačky dávkovače, kde může docházet k dalšímu zpracování vzorku

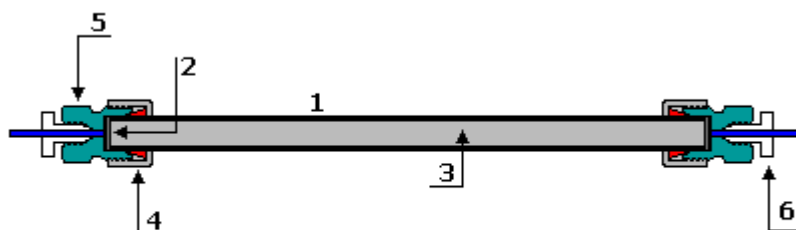
Při dávkování by neměl být přerušen tok mobilní fáze kolonou, této podmínce více vyhovuje druhé zmiňované řešení. K zamezení kontaminace vzorků (crossover, cross contamination) se používá oplach jehly a to jak vnitřní tak vnější oplach. Prostor pro vzorky je v současné době většinou temperován (0-50 °C) a chráněn před světlem.[39]

Kolona

Chromatografická kolona je v podstatě trubka nebo kapilára rovnoměrně naplněná nebo pokrytá stacionární fází. Plášť kolony (hardware) má za úkol tudíž udržet pohromadě stacionární fází, přičemž na hardware kolony jsou kladeny určité požadavky:

- ◆ musí být chemicky inertní
- ◆ musí odolávat poměrně vysokým tlakům
- ◆ vnitřní povrch pláště kolony musí být dostatečně hladký

Nejpoužívanější materiál k výrobě kolon je nerezová ocel (typ 316), plasty (PEEK) nebo sklo. Vlastní klasická HPLC kolona se skládá z kovového pláště (1), který je uzavřen porézní kovovou fritou (2), která zabraňuje uvolňování stacionární fáze (3) z kolony a současně umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Oba konce kolony jsou ukončeny převlečným ochranným kroužkem (4) a koncovou hlavicí (5), ve které je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem (6).



Obr. 6: Chromatografická kolona [39]

Detektory v kapalinové chromatografii

Detektory v HPLC by měly být selektivní pro analyty a málo citlivé na mobilní fázi. Průtočná cela detektoru musí snést tlak mobilní fáze a udržet těsnost.[38]

Detektory jsou umístěny na konci kolony a analyzují eluent. Detektory zaznamenávají rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluovanou složku celou detektoru. Detektory se nejčastěji dělí na detektory *koncentrační* a *hmotnostní*. **Koncentrační detektory** reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky v eluentu dm/dV nezávisle na přívodu složky do detektoru. **Hmotnostní detektory** reagují na změnu hmotnostního toku složky v eluentu dm/dt do detektoru. Jiný způsob dělení je na detektory *nedestrukční* a *destrukční*. V *nedestrukčních* detektorech nedochází k chemické změně detekované komponenty, v *destrukčních* detektorech se detekovaná komponenta ireverzibilně mění.[39]

Na detektor jsou kladeny určité ideální požadavky:

- ◆ možnost detekce všech přítomných komponent (univerzálnost)
- ◆ odezva detektoru by měla být okamžitá a lineární v co nejširším koncentračním rozmezí (široký lineárně dynamický rozsah)
- ◆ vysoká citlivost a nízká úroveň šumu
- ◆ robustní vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty

- ◆ mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučních zón co nejmenší
- ◆ umožnit gradientovou eluci

V praxi takový detektor neexistuje a různé typy detektorů se jednotlivým požadavkům víceméně přibližují.

UV/VIS HPLC detektory

Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně, který vyjadřuje vzájemný vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy, koncentrací absorbující složky a vlastní velikostí absorpce, vyjádřenou jako absorbance (A).[39]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo v teoretické části popsat výrobu červeného vína, blíže se zaměřit na malolaktické kvašení, jeho vliv na obsah antioxidantů ve víně a dále popsat jednotlivé antioxidanty, které se ve víně vyskytují a metodu, kterou byly posléze stanoveny v praktické části.

V praktické části bylo cílem stanovit obsah vybraných antioxidantů a zjistit jak se mění jejich koncentrace v průběhu malolaktické fermentace a následně zjištěné výsledky prodiskutovat s literaturou.

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 Analyzovaný materiál

Pro analýzu byly odebrány vzorky po proběhnutí hlavního kvašení od dvou vinařů (vinař č.1, vinař č.2) ze stejné vinařské podoblasti (Slovácko) a stejné vinařské obce (Polešovice). První den odběru vzorku dané odrůdy je vždy pro oba vzorky (kontrolní, zaočkovaný) společný. U vinaře č.1 byly vzorky odebírány v časovém rozpětí 3 dnů začátkem prosince 2010 až do začátku ledna 2011, kdy prvním dnem je považován den zaočkování. Jednalo se o vzorky odrůdy Cabernet Moravia a Zweigeltrebe.

Další sada vzorků byla poskytnuta vinařem č.2 odebíraných v intervalu 14 dní, s tím že po zaočkování se první vzorek, v případě Zveigeltrebe, odebral až po 44 dnech, stejně jako poslední odběr. U vzorku Cabernet Moravia se odebíraly vzorky v intervalu 14 dní kdy poslední tři dny se interval prodloužil na 45, 45 a 24 dní. Vzorky byl odebírány v období, v případě odrůdy Zweigeltrebe, od konce října 2010 až do poloviny března 2011. V případě odrůdy Cabernet Moravia byly odebírány v období od konce listopadu 2010 do poloviny dubna 2011.

Pro zaočkování byl použit zamražený a sušený startovací preparát na bílé a červené víno vybraný z *Leuconostoc oenos*-kmenu (*Oenococcus oeni*) značky BIOSTART® FORTE SK2.

6.2 Stanovení antioxidantů ve víně metodou HPLC-UV-VIS

6.2.1 Chemikálie a materiál

- ◆ Metanol HPLC GRADE (Fisher Scientific)
- ◆ Acetonitril (ACN)
- ◆ Kyselina trifluoroctová (Fisher Scientific)
- ◆ Standardy antioxidantů:
 - (±)-Catechin hydrate (Sigma – Aldrich)
 - (-)-Epikatechin (Extrasynthese)
 - Kyselina gallová monohydrát (ACROS ORGANICS)
 - Resveratrol (TCI EUROPE)

- Kyselina káвовá (Sigma – Aldrich)
- Kyselina skořicová (Sigma – Aldrich)
- Quercetin (Sigma – Aldrich)
- ◆ Redestilovaná voda (IDPE 8-18 N, Vitrum)
- ◆ Vzorokы vín: Cabernet Moravia, Zweigeltrebe (vinař č.1), Cabernet Moravia, Zweigeltrebe (vinař č.2), Polešovice, podoblast Slovácká

6.2.2 Použité pomůcky a přístroje

- ◆ Analytické váhy (Adam AFA-210 LC)
- ◆ Vialky (HEVLET PACKARD hp)
- ◆ Septa (VITRUM 8 MM)
- ◆ Mikropipeta (TREF LAB, TRANSFERPETTE S 100-1000 µl)
- ◆ Mikrofiltr (LNY 1345-100, LUT Syringe Filters Nylon 13 mm, 0,45 mm, pk/100, LABICOM s.r.o)
- ◆ Ependorfky (Vitrum)
- ◆ Aparatura pro HPLC-UV-VIS (DIONEX ULTIMATE 3000 SYSTEM):
 - detektor (DIONEX Diode Array Detectors, DAD-3000 (RS) and MWS-3000 (RS))
 - pumpa (DIONEX ULTIMATE 3000 SD and RS pump)
 - autosampler (DIONEX ULTIMATE 3000 Autosamplers WPS-3000 SL and WPS-3000 RS)
 - PC s vyhodnocovacím programem Hy Star

6.3 Metodika

Pro stanovení antioxidantů ve víně byla vybrána metoda HPLC s UV-VIS detekcí, kdy standardy i vzorky vín byly proměřovány při vlnové délce 205, 210, 275 a 375 nm. Pro měření byla použita kolona WATREX NUCLEOSIL 120-5 C18 (250x4 mm) o velikosti částic 5 µm a velikosti pórů 120Å (12 nm). Při měření bylo využito gradientové eluce (viz. tab. 6.1.) Jako mobilní fáze A byl použit roztok voda: acetonitril: kyselina trifluoroctová (H₂O : C₂H₃N: C₂HF₃O₂) v poměru 95: 50: 0,035 a jako mobilní fáze B byl použit

roztok těchto látek v poměru 50: 50: 0,025. Eluce probíhala při 30 °C a průtoku 1 ml.min⁻¹. Objem nástřiku vzorku byl 10 µl.

Tab. 3: složení mobilní fáze při gradientové eluci

Čas [min]	MF B [%]	MF A [%]
0	15	85
5	20	80
15	30	70
20	50	50
25	30	70
27	15	85

6.3.1 Postup pro naměření kalibračních křivek epikatechinu, katechinu, kyseliny gallové, resveratrolu, quercetinu, kyseliny kávové a skořicové

Pro přípravu roztoku o požadované koncentraci bylo naváženo 0,001g standardu (±)-katechinu, (-)-epikatechinu, kyseliny gallové, kávové, skořicové, quercetinu a resveratrolu s přesností na 0,0001g. Navážka byla kvantitativně převedena do 10ml odměrné baňky a byla doplněna metanolem po rysku. Získal se tak zásobní roztok o koncentraci 100 µg.ml⁻¹.

Ze zásobního roztoku byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 20, 30 a 50 µg.ml⁻¹ do 10 ml odměrné baňky a následně byly doplněny po rysku mobilní fází A. Takto připravené kalibrační roztoky byly proměřeny za výše popsaných podmínek (viz. kap. 6).

6.3.2 Postup pro stanovení antioxidantů ve víně

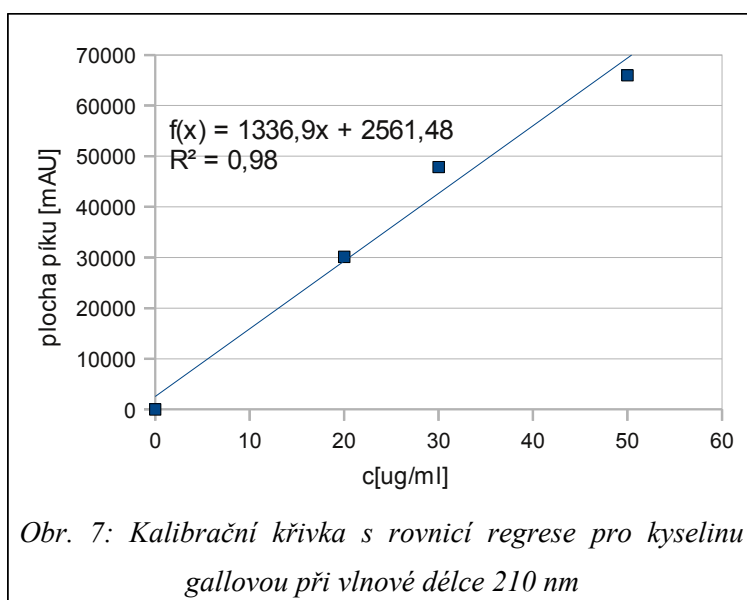
Vzorky vín Cabernet Moravia a Zweigeltrebe od obou vinařů byly šetrně rozmrazeny a přefiltrovány přes mikrofiltr o velikosti pórů 45 µm a uchovány v Ependorfkách o v velikosti 1 ml a poté zamrazeny na teplotu -18 °C. Před vlastní analýzou byly vzorky šetrně rozmrazeny, obsah byl převeden do vialek a uzavřen víčkem s ochranným septem. Vlastní analýza probíhala na zařízení HPLC (DIONEX ULTIMATE 3000 SYSTEMS) za výše popsaných podmínek (viz. kap. 6).

7 VÝSLEDKY A DISKUSE

7.1 Kalibrační křivky standardních látek antioxidantů

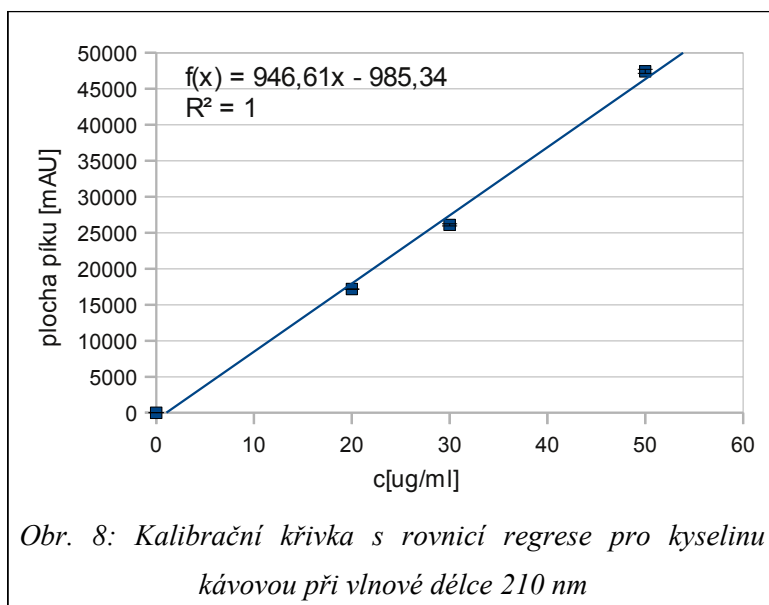
7.1.1 Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení kyseliny gallové

koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	plocha píku [mAU]
20	24 828,150
20	24 806,320
30	38 658,310
30	39 086,880
50	53 642,230
50	54 195,420



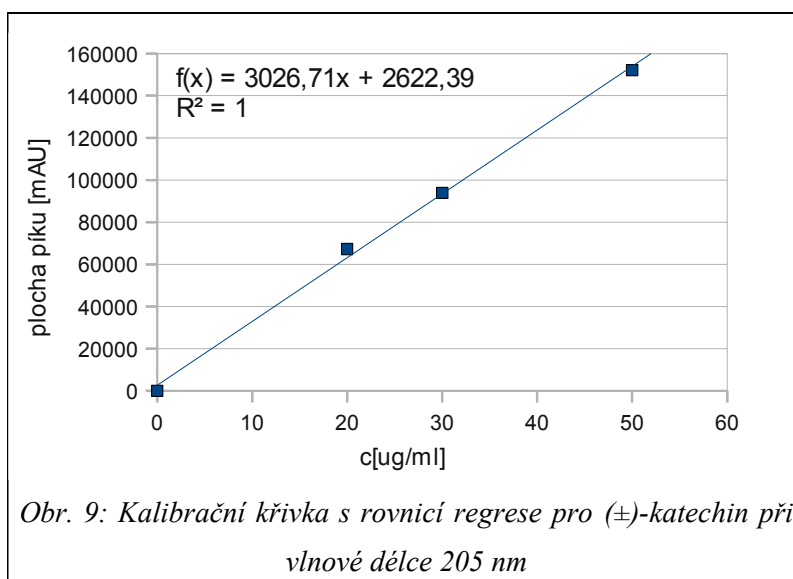
7.1.2 Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení kyseliny kávové

koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	plocha píku [mAU]
20	13 821,840
20	13 775,970
30	24 246,520
30	24 097,440
50	45 390,980
50	45 711,700



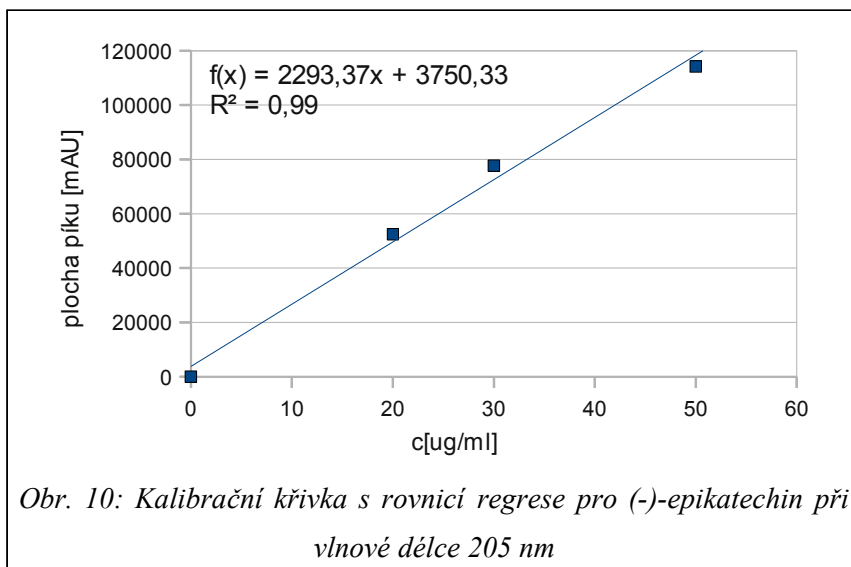
7.1.3 Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení (\pm)-katechinu

<u>koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]</u>	<u>plocha píku [mAU]</u>
20	67 324,630
20	67 113,900
30	93 399,550
30	92 885,820
50	152 055,510
50	152 055,990



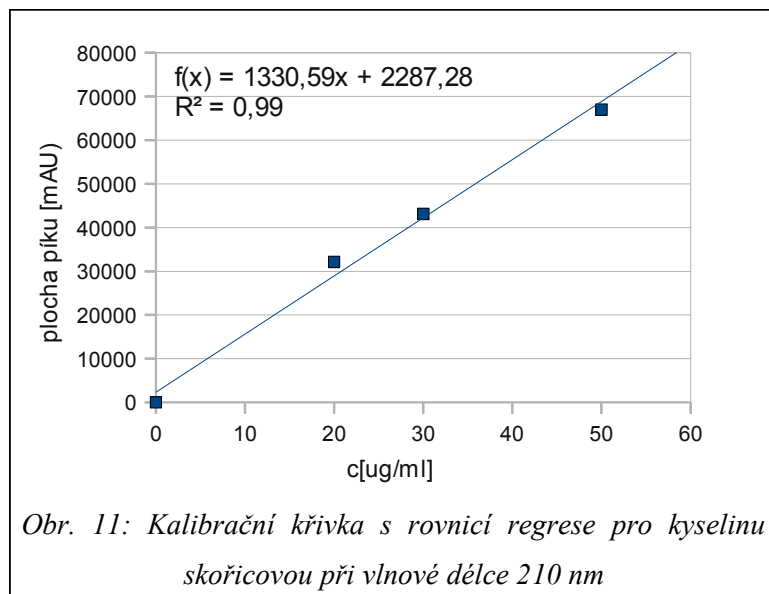
7.1.4 Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení (-)-epikatechinu

<u>koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]</u>	<u>plocha píku [mAU]</u>
20	52 482,910
20	52 422,180
30	77 707,770
30	77 642,690
50	114 597,720
50	113 824,020



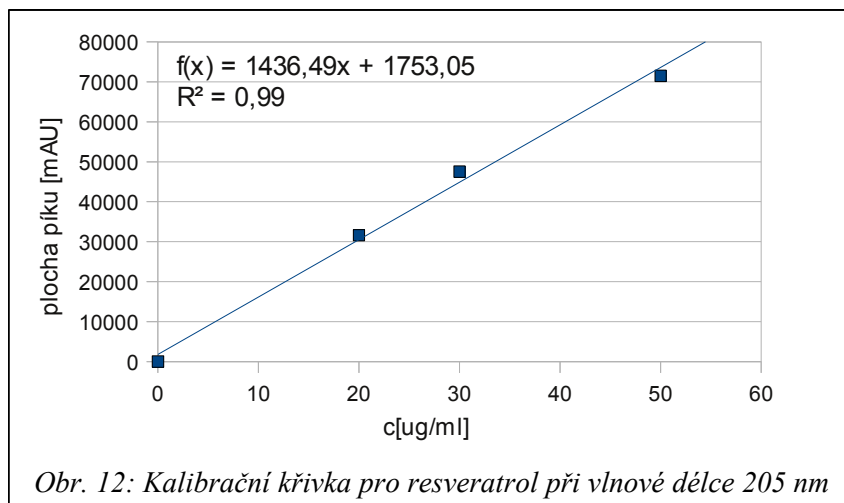
7.1.5 Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení kyseliny skořicové

<u>koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]</u>	<u>plocha píku [mAU]</u>
20	32 268,440
20	32 963,570
30	43 588,440
30	44 097,780
50	67 349,860
50	66 638,790



7.1.6 Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení resveratrolu

<u>koncentrace [ug.ml-1]</u>	<u>plocha píku [mAU]</u>
20	31 615,970
20	31 629,460
30	47 545,810
30	47 490,810
50	71 459,780
50	71 575,680



7.2 Stanovení antioxidantů ve vzorcích vína metodou HPLC-UV-VIS

7.2.1 Stanovení antioxidantů ve vzorcích vína od vinaře č.1

Tab. 4: Obsah vybraných antioxidantů v odrůdě Cabernet Moravia od vinaře č.1

kys. Gallová				
Odběr vzorku [den]	Kontrola [mg.l ⁻¹]	SD	Zaočkovaný [mg.l ⁻¹]	SD
0				
3	25,01	0,119		
6	25,98	0,066		
9	26,49	0,064		
12	26,95	0,003		
15	25,28	0,079		
18	25,28	0,031		
21	27,76	0,069		
24	27,77	0		
28	28,67	0,089		
32	28,58	1,2247		

Kyselinu gallovou nebylo možné stanovit v den prvního odběru vzorku ani u vzorku s kulturou bakterií JMK. Proto nemůže být provedeno jasné porovnání vlivu JMK na obsah antioxidantů.

kys. Kávová				
Odběr vzorku [den]	Kontrola [mg.l ⁻¹]	SD	Zaočkovaný [mg.l ⁻¹]	SD
0	1,16	0,016	1,16	0,016
3	2,07	0,007	1,23	0,001
6	1,99	0,014	1,27	0,014
9	2	0,017	1,27	0,007
12	2,05	0,026	1,53	0,018
15	2,02	0,01	1,66	0,008
18	2,04	0,023	1,81	0,014
21	2,17	0,01	2,14	0,022
24	2,03	0,027	1,8	0,011
28	2,15	0,026	2,3	0,02
32	1,76	0,281	1,98	0,007

Obsah kyseliny kávové se u kontrolního vzorku držel po celou dobu odběru kolem 2 mg.l⁻¹, posledním dnem ale její obsah klesl. U zaočkovaného vzorku se naopak obsah kyseliny kávové postupně zvyšuje a je dokonce vyšší než u vzorku kontrolního

(±)-katechin				
Odběr vzorku [den]	Kontrola [mg.l ⁻¹]	SD	Zaočkovaný [mg.l ⁻¹]	SD
0	10,32	0,021	10,32	0,021
3	17,15	0,182	11,11	0,58
6	15,01	0,056	9,03	0,003
9	14,75	0,027	8,97	0,002
12	14,93	0,01	10,48	0,012
15	13,24	0,004	9,74	0,438
18	13,66	0,032	10,07	0,005
21	14,99	0,03	11,14	0,01
24	13,64	0,003	7,39	0,002
28	14,05	0,02	9,58	0,024
32	7,01	6,042	8,72	0,015

Obsah (±)-katechinu je vyšší u kontrolního vzorku vína, ale s dobou odběru se jeho koncentrace snižuje. Poslední odběr nemůže být brán v úvahu díky velké směrodatné odchylce.

(-)-epikatechin				
Odběr vzorku [den]	Kontrola [mg.l ⁻¹]	SD	Zaočkovaný [mg.l ⁻¹]	SD
0	18,47	0,077	18,47	0,077
3	28,52	0,263	20,7	0,135
6	23,61	0,135	14,78	0,018
9	23,52	0,084	14,46	0,003
12	23,88	0,076	19,05	0,014
15	20,12	0,021	17,96	0,042
18	20	0,015	17,5	0,016
21	23,7	0,064	20,93	0,006
24	20,08	0,012	12,35	0,003
28	21,38	0,005	16,03	0,032
32	20,18	0,825	11,56	0,016

Obsah (-)-epikatechinu je v kontrolním vzorku celkově vyšší v porovnání se zaočkovaným vínem. Dokonce i v při posledním dnu odběru se jeho obsah nijak výrazně nemění.

Tab. 5: Obsah vybraných antioxidantů v odrůdě Zweigeltrebe od vinaře č.1

kys. Kávová				
Odběr vzorku [den]	Kontrola [mg.l ⁻¹]	SD	Zaočkovaný [mg.l ⁻¹]	SD
0	1,54	0,078	1,54	0,078
3	1,77	0,041	1,6	0,135
6	1,75	0,042	1,67	0,043
9	1,82	0,009	1,71	0,091
12	1,48	0,412	1,83	0,56
15	1,75	0,075	1,77	0,16
18	1,72	0,031	1,71	0,037
21	1,73	0,006	1,48	0,045
24	1,77	0,037	1,75	0,056
28			2,54	0,015
32				

Obsah kyseliny kávové nebylo možné změřit u posledních dvou odběrů, jelikož došlo k překrytí píků. V porovnání s kontrolním vzorkem koncentrace kyseliny kávové postupně roste během odběrů a dostává na hodnotu 2,54 mg.l⁻¹.

(±)-katechin				
Odběr vzorku [den]	Kontrola [mg.l ⁻¹]	SD	Zaočkovaný [mg.l ⁻¹]	SD
0	14,33	0,051	14,33	0,051
3	15,39	0,012	15,58	0,191
6	15,02	0,022	15,44	0,012
9	15,33	0,007	15,44	0,004
12	8,65	8,983	15,92	0,015
15	14,49	0,686	14,76	0,022
18	13,57	0,027	15,2	0,031
21	14,68	0,957	15,02	0
24	13,25	0,024	14,92	0,001
28	15,21	0,059	15,86	0,0129
32	15,35	0,018	15,81	0,055

Obsah (±)-katechinu je vyšší u zaočkovaného vzorku BMK než u kontrolního. Navíc jeho obsah se, i když nevýrazně, zvyšuje.

(-)-epikatechin				
Odběr vzorku [den]	Kontrola [mg.l ⁻¹]	SD	Zaočkovaný [mg.l ⁻¹]	SD
0	29,16	2,389	29,16	2,389
3	34,71	0,12	33,55	0,457
6	34,23	0,123	33,87	0
9	35,61	0,077	33,58	0,046
12	20,11	20,764	34,86	0,037
15	32,43	0	32,22	0,035
18	26,68	0,016	31,89	0,027
21	30,44	0,023	33,77	1,116
24	29,66	0,071	31,19	1,329
28	36,15	0,008	34,05	0,137
32	35,32	0,138	33,57	0,133

Obsah (-)-epikatechinu je u zaočkovaného vzorku téměř stabilní, kdežto u kontrolního vzorku dochází k jeho koncentračním výkyvům. Navíc ve 12 dnu odběru je zjištěná velká směrodatná odchylka.

7.2.2 Stanovení antioxidantů ve vzorcích vína od vinaře č.2

Tab. 6: Obsah vybraných antioxidantů v odrůdě Cabernet Moravia od vinaře č.2

kys. Gallová				
Odběr vzorku [den]	Kontrola [mg.l ⁻¹]	SD	Zaočkovaný [mg.l ⁻¹]	SD
0	54,63	0,067	54,63	0,067
14	57,12	0,167	56,1	0,166
28	57,9	0,43	57,15	0,145
42	60,25	0,083	60,14	0,108
56	62,05	0,01	56,62	0,077
70	60,81	0,101	56,14	0,055
84	61,38	0,004	59,48	0,167
98	60,79	0,22	59,16	0,127
143	62,38	0,113	66,56	0,147
188	61,66	0,027	66,43	0,207
212	63,37	0,531	79,29	13,902

Obsah kyseliny gallové je u kontrolního vzorku vyšší, ale v posledních dnech odběru jasně převyšuje koncentrace kyseliny gallové u zaočkovaného vzorku nad kontrolním. Bohužel u posledního odběru byla vypočtena velká směrodatná odchylka.

kys. Kávová				
Odběr vzorku [den]	Kontrola [mg.l ⁻¹]	SD	Zaočkovaný [mg.l ⁻¹]	SD
0	1,9	0,036	1,9	0,036
14	1,93	0,042	2,3	0,3
28	2,33	0,023	2,35	0,014
42	2,44	0,005	2,2	0,002
56	2,5	0,038	2,41	0,006
70	2,27	0,019	2,19	0,066
84	2,26	0,011	2,25	0,009
98	2,26	0,019	2,47	0,002
143	2,29	0,01	2,82	0,009
188	2,3	0,016	2,82	0,026
212	2,29	0,001	2,9	0,034

Obsah kyseliny kávové u zaočkovaného vzorku během odběru postupně převyšuje koncentraci této kyseliny v kontrolním vzorku. V 70 dnu odběru u obou vzorků nastává prudký zlom, kdy se obsah kyseliny sníží.

(±)-katechin				
Odběr vzorku [den]	Kontrola [mg.l ⁻¹]	SD	Zaočkovaný [mg.l ⁻¹]	SD
0	44,86	0,115	44,86	0,115
14	42,5	0,23	43,82	0,06
28	41,75	0,497	41,91	0,042
42	40,72	0,135	41,17	0,003
56	40,72	0,123	36,91	0,161
70	36,25	0,006	33,67	0,008
84	36,46	0,01	35,62	0,012
98	35,02	0,035	35,57	0,008
143	35,57	0,011	43,59	0,554
188	34,68	0,016	41,87	0,07
212	34,64	0,039	44,35	0,08

Obsah (±)-katechinu je při posledním odběru až o 28% vyšší u vzorku s BMK než u kontrolního vzorku. Při odběru 5 a 6 vzorku se ale obsah katechinu prudce snížil.

(-)-epikatechin				
Odběr vzorku [den]	Kontrola [mg.l ⁻¹]	SD	Zaočkovaný [mg.l ⁻¹]	SD
0	86,71	0,007	86,71	0,007
14	78,9	0,145	84,45	0,015
28	78,89	0,549	80,03	0,049
42	76,14	0,065	77,97	0,023
56	75,3	0,289	69,99	0,048
70	68,23	0,033	64,37	0,033
84	68,59	0,018	66,36	2,85
98	65,9	0,085	66,74	0,089
143	66,52	0,015	70,44	0,13
188	64,47	0,046	67,46	0,099
212	64,16	0,061	70,29	0,053

Obsah (-)-epikatechinu je u obou vzorků nižší než na začátku měření. Ovšem u zaočkovaného vzorku obsah epikatechinu převyšuje jeho koncentraci u kontrolního vzorku.

Tab. 7: Obsah vybraných antioxidantů v odrůdě Zweigeltrebe od vinaře č.2

kys. Gallová				
Odběr vzorku [den]	Kontrola [mg.l ⁻¹]	SD	Zaočkovaný [mg.l ⁻¹]	SD
0	23,41	0,498	23,41	0,498
14	31,64	0,66	25,45	0,77
58	25,7	0,895	28,33	0,127
72	27,68	0,277	29,33	0,348
86	26,58	0,753	36,92	0,043
100	41,62	0,509	70,04	0,252
114	35,16	0,689	73,069	6,528
128	50,71	0,31	71,79	0,1
142	42,76	0,202	70,11	0,032
156	37,34	0,116	67,07	0,067
201	50,4	0,085	40,2	35,492

Obsah kyseliny gallové se od druhé poloviny odběrů u zaočkovaného vzorku téměř dvojnásobně zvýšil. U kontrolního vzorku došlo také k tomuto nárůstu, ovšem při dalších odběrech došlo k významnému poklesu.

kys. Kávová				
Odběr vzorku [den]	Kontrola [mg.l ⁻¹]	SD	Zaočkovaný [mg.l ⁻¹]	SD
0				
14			1,87	0,044
58	1,36	0,004	1,6	0,016
72	1,4	0,015	1,65	0,005
86	1,83	0,02	1,76	0,009
100	1,92	0,016	2,87	0,023
114	1,8	0,025	2,74	0,03
128	1,61	0,041	2,38	0,042
142	1,47	0,029	2,36	0,043
156	1,34	0,11	2,8	0,039
201	1,55	0,088	1,97	0,97

Obsah kyseliny kávové nebylo možné změřit při prvních dvou odběrech u kontrolního vzorku, protože došlo k překrytí ploch píků. Maximální hodnoty byly naměřeny v polovině odběrů u obou vzorků, poté obsah kyseliny klesal.

(±)-katechin				
Odběr vzorku [den]	Kontrola [mg.l ⁻¹]	SD	Zaočkovaný [mg.l ⁻¹]	SD
0	25,33	0,123	25,33	0,123
14	24,93	0,104	23,88	0,254
58	21,01	0,157	24,26	0,1
72	20,69	0,111	21,13	0,049
86	20,42	0,062	21,23	0,171
100	20,67	0,032	21,07	0,05
114	19,58	0,038	28,85	0,074
128	20,89	0,314	28,14	0,062
142	21,54	0,347	33,2	0,03
156	20,43	0,215	32,52	0,042
201	23,88	0,256	24,91	0,22

Obsah (±)-katechinu se výrazně neměnil v průběhu odběru u kontrolního vzorku, kdežto u vzorku s BMK došlo k poklesu a opětovnému zvýšení jeho koncentrace.

(-)-epikatechin				
Odběr vzorku [den]	Kontrola [mg.l ⁻¹]	SD	Zaočkovaný [mg.l ⁻¹]	SD
0	55,79	0,59	55,79	0,59
14	55,65	0,462	52,88	0,714
58	38,49	0,672	37,79	0,105
72	36,66	0,4	38,1	0,4
86	37,75	0,38	39,13	0,095
100	35,37	0,102	58,33	27,241
114	30,99	0,056	71,62	0,257
128	37,19	0,148	71,33	0,052
142	33,97	0,169	67,86	0,006
156	30,52	0,118	66,63	0,071
201	37,67	0,032	23,7	21,436

Obsah (-)-epikatechinu byl u zaočkovaného vzorku vyšší. Maxima bylo naměřeno v druhé polovině odběrů. Při 6 a posledním 11 odběru došlo ale k výpočtu velké směrodatné odchylky, proto by se výsledek z těchto dní neměl brát v úvahu. U kontrolního vzorku si můžeme všimnout výkyvů v koncentraci (-)-epikatechinu.

7.3 Diskuse

Pro vybrané antioxidanty byly sestrojeny z naměřených dat kalibrační křivky, které jsou uvedeny výše. Pro quercetin nemohla být sestrojena kalibrační křivka, neboť jej nebylo možné detekovat. Jeho stanovení touto metodou je velmi obtížné.

Retenční časy vybraných standardů byly 3,02 min pro kyselinu gallovou, 6,95 min pro (±)-katechin, 9,27 min pro kyselinu kávovou, 10,33 min pro (-)-epikatechin, 26,81 min pro resveratrol a 28,21 min pro kyselinu skořicovou.

Ve vzorcích nebylo možné stanovit kyselinu skořicovou ani resveratrol, neboť žádný retenční čas naměřených píků neodpovídal retenčním časům standardů. Nepřítomnost resverarolu by se dala vysvětlit tím, že o hrozny ve vinnicích bylo dobře postaráno. Resveratrol se v rostlinách tvoří totiž pokud jsou napadeny šedou plísní, vystaveny stresu nebo přílišnému UV záření.

Výsledky z analýzy vzorků jsou uvedeny v tabulkách. Pro lepší vizualizaci jsou pak do přílohy dány grafy výsledků měření. Výsledky antioxidantů v tabulkách jsou naměřeny při vlnové délce 205 nm ((±)-katechin, (-)-epikatechin) a 210 nm (kyselina gallová a kávová).

U vzorku Cabernet Moravia (CM) a Zweigeltrebe (ZW) od vinaře č.1 nebylo možné změřit plochu píku kyseliny gallové u vzorku s přidavkem bakterií JMK, protože docházelo k překrývání několika píků. Pro rozlišení by bylo třeba provést metodu standardního přídatku. Stanovení kyseliny gallové bylo možné provést jen u nezaočkovaných vzorků CM (kontrola), kde je patrné že v průběhu 32 dnů došlo k nárůstu obsahu této kyseliny. Při odběru 6 a 7 vzorku (15-17 den od inokulace), ale došlo k poklesu jejího obsahu. Jedná se o hrubou chybu vzorku. Stejný pokles je patrný i u kontrolních vzorků při analýze katechinu a epikatechinu. Nejvyšší hodnoty obsahu kyseliny gallové bylo dosaženo 28 den odběru, $28,67 \pm 0,089 \text{ mg.l}^{-1}$.

U kyseliny kávové došlo k jejímu nárůstu během JMK i u kontrolního vzorku vína u obou odrůd. Zvyšování obsahu kyseliny kávové u zaočkovaného vzorku však bylo mnohem pomalejší. Při měření je zřejmý pokles jejího obsahu v 12 dnu odběru. Tento pokles je zřetelný i u katechinu a epikatechinu téhož vzorku. Lze jej vysvětlit stejně jako u kyseliny gallové hrubou chybou vzorku. Navíc u všech tří antioxidantů je vypočtena velká směrodatná odchylka, která poukazuje na tuto chybu. Pro odrůdu ZW nebylo u posledních dvou odběrů možné stanovit obsah kyseliny kávové, neboť došlo k překrytí více

píků. Nejvyšší hodnoty, $2,54 \pm 0,015 \text{ mg.l}^{-1}$, bylo dosaženo u zaočkovaného vzorku odrůdy ZW.

Obsah katechinu a epikatechinu, u odrůdy CM, byl vyšší u kontrolních vzorků než u vzorků kde byly zaočkovány BMK. U obou vzorků si ale můžeme všimnout poklesu koncentrace v průběhu odběru vzorků. Kdežto u odrůdy ZW nedochází u zaočkovaného vzorku ke koncentračním výkyvům těchto antioxidantů, nijak významně se nemění jejich obsah a je vyšší než u kontrolního vzorku. Nicméně nejvyšší hodnoty katechinu byly naměřeny v odrůdě CM u kontrolního vzorku 3 den odběru, $17,15 \pm 0,182 \text{ mg.l}^{-1}$, stejně jako u epikatechinu. Pro něj byl nejvyšší obsah naměřen v odrůdě CM u kontrolního vzorku 28 den. Jeho obsah byl $36,15 \pm 0,008 \text{ mg.l}^{-1}$.

U vzorku od vinaře č.2 odrůdy CM si můžeme všimnout, že pátý odběr (56 den po zaočkování) byl zlomový jak pro kontrolní vzorky, tak i pro vzorky kde byla použita kultura bakterií JMK. U kontrolního vzorku došlo ke stabilizaci koncentrace kyseliny gallové, kávové, katechinu a epikatechinu. Celkový obsah kyseliny kávové a gallové se zvýšil, ale u katechinu a epikatechinu došlo k jeho snížení. Při porovnání vzorku, kde byly použity bakterie JMK, se obsah kyseliny gallové a kávové zvýšil výrazněji. Obsah kyseliny gallové dosáhl hodnoty $66,43 \pm 0,207 \text{ mg.l}^{-1}$. Poslední hodnota $79,29 \text{ mg.l}^{-1}$ by neměla být brána v úvahu jelikož je zatížena velkou chybou. Obsah kyseliny kávové dosáhl hodnoty $2,9 \pm 0,034 \text{ mg.l}^{-1}$.

Obsah katechinu u zaočkovaného vzorku dosáhl téměř původní hodnoty. Jeho obsah byl $44,35 \pm 0,08 \text{ mg.l}^{-1}$. Nejvyšší koncentrace epikatechinu bylo dosaženo při 9 odběru (143 den po inokulaci). Jeho obsah byl $70,44 \pm 0,13 \text{ mg.l}^{-1}$.

V odrůdě ZW od vinaře č.2 se obsah antioxidantů výrazně zvýšil u vzorku, kde bylo použito bakterií JMK. Při posledních čtyřech odběrech se jejich koncentrace ale začala snižovat. Poslední den odběru (201 den po inokulaci) by se v případě kyseliny gallové a epikatechinu neměl brát v úvahu, neboť je zatížen velkou chybou. Nejvyšších koncentrací bylo dosaženo v polovině měření (100 – 114 den po inokulaci). Koncentrace kyseliny kávové byla $2,87 \pm 0,023 \text{ mg.l}^{-1}$, $28,85 \pm 0,074 \text{ mg.l}^{-1}$ katechinu, $71,62 \pm 0,257 \text{ mg.l}^{-1}$ epikatechinu. Obsah kyseliny gallové byl nejvyšší u sedmého odběru, ale z důvodu vyšší hodnoty směrodatné odchylky, v porovnání s ostatními, jej není možné uvést. Proto se bere v úvahu druhá nejvyšší hodnota $71,79 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$.

U kyseliny kávové nebylo možné provést odečtení plochy píku u dvou prvních odběrů, jelikož jej nebylo možné určit stejně jako u posledního odběru v případě kyseliny gallové.

Plochy píků se překrývaly. Pro jejich určení by bylo třeba zavést metodu standardního přídatku.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zjistit jaký vliv má malolaktické kvašení na obsah antioxidantů v červeném víně. Pro stanovení byla vybrána metoda HPLC s UV-VIS detekcí. Tato metoda byla vybrána pro svou vysokou účinnost a opakovatelnost. Zkoumané polyfenoly nejsou látky těkavé, tudíž dobře separovatelné pomocí HPLC a snadno detekovatelné v UV spektru.

Pro analýzu byly poskytnuty vzorky révových vín odrůdy Cabernet Moravia a Zweigeltrebe od dvou vinařů ze stejné podoblasti (Slovácko) a stejné vinařské obce (Polešovice). Po proběhnutí hlavního kvašení byla část mladého vína zaočkována bakteriemi mléčného kvašení (*Oenococcus oeni*) a zbytek byl ponechán jako kontrolní vzorek. Z kontrolních i zaočkovaných vín, byly postupně odebírány vzorky a následně analyzovány dle popsané metodiky.

Podle výsledků se zdá, že malolaktická fermentace má pozitivní vliv na obsah antioxidantů v červeném víně. Z krátkodobého hlediska dochází během prvních dní (30-50) k mírnému nárůstu obsahu antioxidantů jak u kontrolního vzorku tak i u vzorku, který byl zaočkovaný bakteriemi jablečno-mléčného kvašení. Pouze u odrůdy Zweigeltrebe je v tomto období rozdíl, i když se jednalo o víno z jedné vinařské obce.

Po 50 dnu odběru nastává u obou odrůd zlom, kdy se obsah, u zaočkovaného vzorku, zvýší, zatím co u kontrolního vzorku koncentrace antioxidantů zůstává na přibližně stejné úrovni a nijak významně se nemění.

Jelikož během stanovení jednotlivých polyfenolů došlo k tomu, že je nebylo možné zcela přesně určit, doporučila bych při dalším výzkumu nejprve jejich extrakci ze vzorků vína.

Na základě výsledků by bylo vhodné zařadit malolaktickou fermentaci jako samostatnou operaci ve výrobě vína, za použití selektovaných bakteriálních kultur. Díky tomu, že obliba a tudíž i spotřeba vína neustále stoupá, by spotřebitelé udělali správný krok ke zdraví.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PAVLOUŠEK, P., *Výroba vína u malovinařů*, 1.vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2006. 100s. ISBN 80-247-1247-4
- [2] KADLEC, P. a kol., *Technologie potravin II*, 1.vyd. Praha 6: Vydavatelství VŠCHT Praha 2002. 236s. ISBN 80-7080-510-2
- [3] ŠEVČÍK, L., *Hledání pravdy o víně, Červená vína*, 1. vyd. Praha Grada Publishing, 1999. 139 s. ISBN 80-7169-840-7
- [4] KRAUS, V., FOFFOVÁ, Z., VURM, B., *Nová encyklopedie českého a moravského vína*, 1.vyd. Praha: Praga Mystica, 2008. 113 s. ISBN 978-80-86767-09-3
- [5] BALÍK, J., *Vinařství, návody do laboratorních cvičení*, 3. vyd. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2006. 98 s. ISBN 80-7157-933-5
- [6] DRDÁK, M. *Základy potravinářských technologií: spracovanie rastlinných a živočišných surovín. Cererálne a fermentačné technológie. Uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*, 1. vyd. Bratislava : Malé centrum, 1996. 495 s. ISBN 8096706411
- [7] MORENO-ARRIBAS, M; POLO, M., *Wine chemistry and biochemistry*, New York : Springer 2009, 735 s. ISBN: 978-0387-74116-1
- [8] JACKSON, Ron S. *Wine science : principles, practice, perception*, 2nd ed. Academic Press 2000, 654 s. . ISBN: 978-0-12-379062-0
- [9] PAVLOUŠEK, P., *Výroba vína u malovinařů*, 2., aktualiz. a rozš. Vyd. Praha : Grada, 2010. 120 s., [8] s. barev. obr. příl. : il. ISBN 978-80-247-3487-3
- [10] Potravinářská mikrobiologie I – Mikroorganismy v potravinářství
- [11] PARKÁNYIOVÁ, J., PARKÁNYIOVÁ, L., POKORNÝ, J. *Rostliny jako zdroje přírodních antioxidantů* [online]. 01.08.2003 [cit.2009-07-01]. Dostupné z <http://www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/p/P_30C.doc>
- [12] SSHAHIDI, F., *Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications*, AOCS press, 1997, 414 s., ISBN 0-935315-77-2
- [13] LACHMAN, J., HAMOUZ, K., ORSÁK, M., *Červeně a modře zbarvené brambory – významný zdroj antioxidantů v lidské výživě*, Chem. Listy 99, 474 – 482 (2005)
- [14] GNJOM, I., D'ARCY, B., CAFFIN, N., GIDLEY, M., *Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process*, Elsevier

- 2011, Food chemistry, ISSN 0308-8146
- [15] ČEPIČKA, J., KARABÍN, M., *Polyfenolové látky piva – přirozené antioxidanty*, Chem. Listy 96, 90 - 95 (2002)
- [16] SLANINA, J., TÁBORSKÝ, E., *Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka*, Chem. Listy 98, 239 – 245 (2004)
- [17] URL:<<http://www.ajcn.org/content/79/5/727.full>> [cit. 21.1.2011]
- [18] ONDREJOVIČ, M., MALIAR, T., POLÍVKA, L., ŠILHÁR, S., *Polyfenoly jablk*, Chem. Listy 103, 394–400 (2009)
- [19] HOLEČEK, V., ROKYTA, R., VLASÁK, R., *Antioxidanty a jejich gastrointestinální absorpce a interference jejich účinku* [online]. 10.6.2008 [cit.28.2.2009]. <195.250.138.169/fyziologie/documents/Holecek.pdf >
- [20] POSPÍŠIL, J., *Antioxidanty*, 1. vyd., Praha: ACADEMIA,1968, 274s.
- [21] ŠTOČKOVÁ, L., MATĚJOVÁ, E., JANOVSKÁ, D., SÝKOROVÁ, S., *Porovnání výsledků tří analytických metod pro stanvení obsahu rutinu v pohance tatarské*, Chem. Listy 103, 827-831 (2009)
- [22] ŠMIDRKAL, J., FILIP, V., MELZUCH, K., HANZLÍKOVÁ, I., BUCKIOVÁ, D., KRŮSA, B.,*Resveratrol*, Chem. Listy 95,602-609 (2001)
- [23] URL:<orion.sci.muni.cz/virtuallab/navody/HPLC.pdf> [cit. 5.2.2011]
- [24] GURBUZ, O. a kol., *Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection*, Food Chemistry, vol. 100, issue 2, 2007, s. 518-525, ISSN: 0308-8146
- [25] YANG, J., GUO, J., YUAN, J., *In vitro antioxidant properties of rutin*, LWT - Food Science and Technology, vol. 41, issue 6, July 2008, s. 1060-1066
- [26] SAIKO, P.,SZAKMARY, A., JAEGER, W., SZEKERES, T., *Resveratrol an its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?*, Mutation Research/Reviews in Mutation Research, vol. 658, issues 1-2, January-February 2008, s. 68-94
- [27] GEROGIANNAKI-CHRISTOPOULOU, G., ATHANASOPOULUS, P., KYRIAKIDIS, N., GEROGIANNAKI, I. A., SPANOS, M., *trans-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties*, Food Control, vol. 17, Issue 9, September 2006, s. 700-706

- [28] FILIP, V., PLOCKOVÁ, M., ŠMIDRKAL, J., ŠPIČKOVÁ, Z., MELZUCH, K., SCHMIDT Š., *Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness*, *Food chemistry*, vol. 83, issue 4, December 2003, s. 585-593
- [29] CHANDER, V., SINGH, D., CHOPRA, K., *Catechin, a natural antioxidant protects against rhabdomyolysis-induced myoglobinuric acute renal failure*, Elsevier, *Pharmacological Research*, vol. 48, issue 5, November 2003, s. 503-509
- [30] HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C., *Antioxidant potential of ferulic acid*, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 13, issue 4, October 1992, s. 435-448
- [31] ZHAO, Z., MOGHADASIAN, M. H., *Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review*, *Food Chemistry*, vol. 109, Issue 4, 15 August 2008, s. 691-702
- [32] KVASNIČKOVÁ, A., *Vlastnosti a použití ferulové kyseliny* [online], č. 579, Únor. 2001, [cit. 19.2.2011] Dostupné z URL:<<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=13&typ=1&val=579&ids=153>>
- [33] GIL-LONGO, J., GONZÁLES-VÁZQUEZ, C., *Vascular pro-oxidant effects secondary to the autoxidation of gallic acid in rat aorta*, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 21, issue 4, April 2010, s. 304-309
- [34] LU Z., NIE G., BELTON P. S., TANG H., ZHAO B., *Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives*, *Neurochemistry International*, vol. 48, issue 4, March 2006, s. 263-274
- [35] LIN, X., HE, J., ZHA, Z., *Simultaneous determination of quercetin and rutin at a multi-wall carbon-nanotube paste electrodes by reversing differential pulse voltammetry*, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 119, issue 2, 7 December 2006, s. 608-614
- [36] CHANG, CH., WU, R., *Quantification of (+)-catechin and (-)-epicatechin in coconut water LC-MS*, *Food chemistry*, vol 126, issue 2, 15 May 2011, s. 710-717
- [37] F. GRIS., E., MATTIVI, F., FERRIERA, E. A., VRHOVSEK, U., PEDROSA, R. C., BORDIGNON-LUIZ, M. T., *Proanthocyanidin profile and antioxidant capacity of Brazilian Vitis vinifera red wines*, *Food Chemistry*, vol. 126, issue 1, 1 May 2011, s. 213-220
- [38] KLOUDA, P., *Moderní analytické metody*, Ostrava : Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2 (brož.)

- [39] DOUŠA, M., *HPLC.cz* [online], Last modified: 24. ledna 111 [cit. 9.42011]
<<http://www.hplc.cz/>>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

°ČNM Československý normalizovaný moštoměr

°KL Klosterneuburský moštoměr

aj. A jiné

atd. A tak dále

BMK bakterie mléčného kvašení

BOK Biologické odbourávání kyselin

CM Cabernet Moravia

CO₂ oxid siřičitý

DNA Deoxyribonukleová kyselina

FA ferulová kyselina

HBA Hydroxybenzoová kyselina

HCA Hydroxyskořicová kyselina

HIV Human Immunodeficiency Virus

HPLC High-performance liquid chromatography

CHD coronary heart disease

JMK jablečno-mléčné kvašení

KTJ kolonie tvořící jednotku

LDL Low-density lipoprotein

MPa Megapaskal

např. Například

nm Nanometr

PEEK Polyether ether ketone

PUFA Polyunsaturated fatty acids

RV Resveratrol

SD Směrodatná odchylka

SO₂ Oxid siřičitý

spol. Společníci

SSVK Aktivované sušené vlnářské kvasinky

tj. To je

UV Ultrafialové záření

zvl. Zvlášť

ZW Zweigeltrebe

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Flavan[19].....	32
Obr. 2: Struktura flavanolových monomerů [7].....	33
Obr. 3: Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilben).....	36
Obr. 4: Hydroxyskořicová kyselina.....	37
Obr. 5: Hydroxybenzoová kyselina.....	38
Obr. 6: Chromatografická kolona [39].....	43
Obr. 7: Kalibrační křivka s rovnicí regrese pro kyselinu gallovou při vlnové délce 210 nm.. 50	
Obr. 8: Kalibrační křivka s rovnicí regrese pro kyselinu kávovou při vlnové délce 210 nm... 51	
Obr. 9: Kalibrační křivka s rovnicí regrese pro (±)-katechin při vlnové délce 205 nm.....	51
Obr. 10: Kalibrační křivka s rovnicí regrese pro (-)-epikatechin při vlnové délce 205 nm.	52
Obr. 11: Kalibrační křivka s rovnicí regrese pro kyselinu skořicovou při vlnové délce 210 nm.....	53
Obr. 12: Kalibrační křivka pro resveratrol při vlnové délce 205 nm.....	53

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Struktury hydroxyskořicové kyseliny ve víně [7].....	37
Tab. 2: Struktury kyseliny hydroxybenzoové ve víně [7].....	38
Tab. 3: složení mobilní fáze při gradientové eluci.....	49
Tab. 4: Obsah vybraných antioxidantů v odrůdě Cabernet Moravia od vinaře č.1.....	54
Tab. 5: Obsah vybraných antioxidantů v odrůdě Zweigeltrebe od vinaře č.1.....	56
Tab. 6: Obsah vybraných antioxidantů v odrůdě Cabernet Moravia od vinaře č.2.....	57
Tab. 7: Obsah vybraných antioxidantů v odrůdě Zweigeltrebe od vinaře č.2.....	59

SEZNAM PŘÍLOH

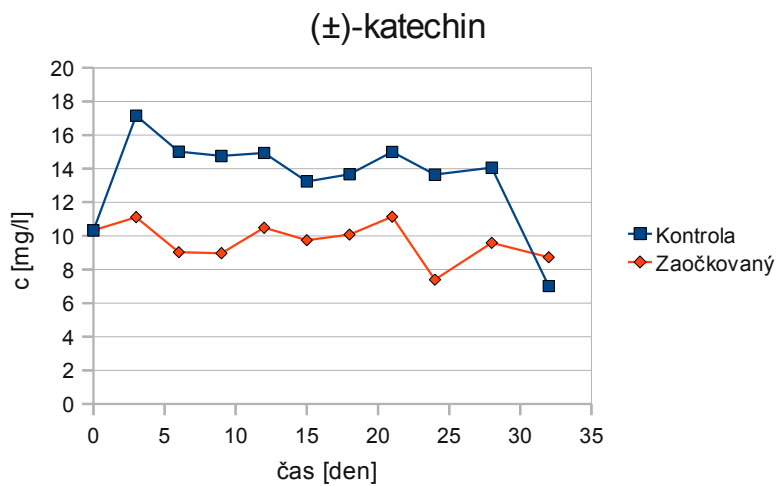
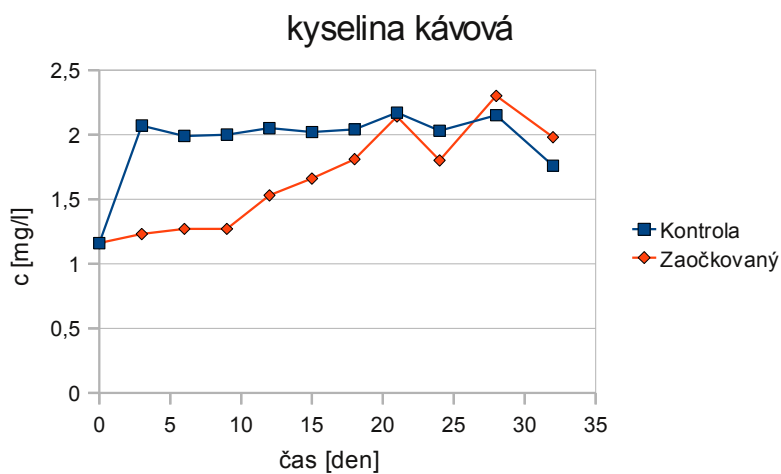
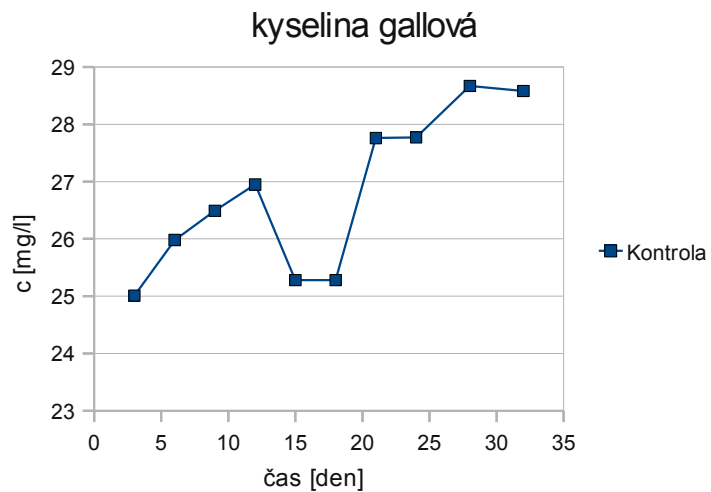
Příloha P 1: Grafické znázornění vývoje koncentrace antioxidantů v odrůdě cabernet moravia od vinaře č.1

Příloha P 2: Grafické znázornění vývoje koncentrace antioxidantů v odrůdě Zweigeltrebe od vinaře č.1

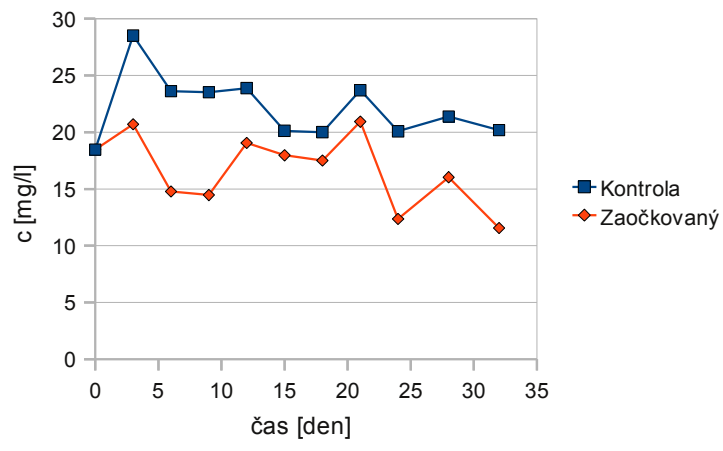
Příloha P 3: Grafické znázornění vývoje koncentrace antioxidantů v odrůdě cabernet moravia od vinaře č.2

Příloha P 4: Grafické znázornění vývoje koncentrace antioxidantů v odrůdě Zweigeltrebe od vinaře č.2

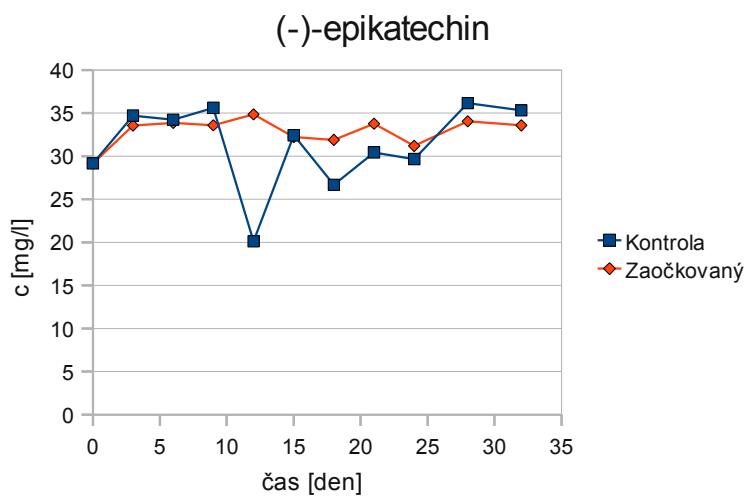
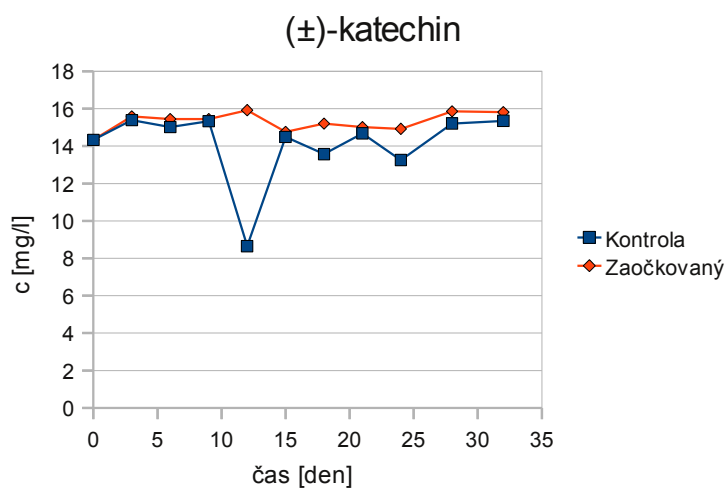
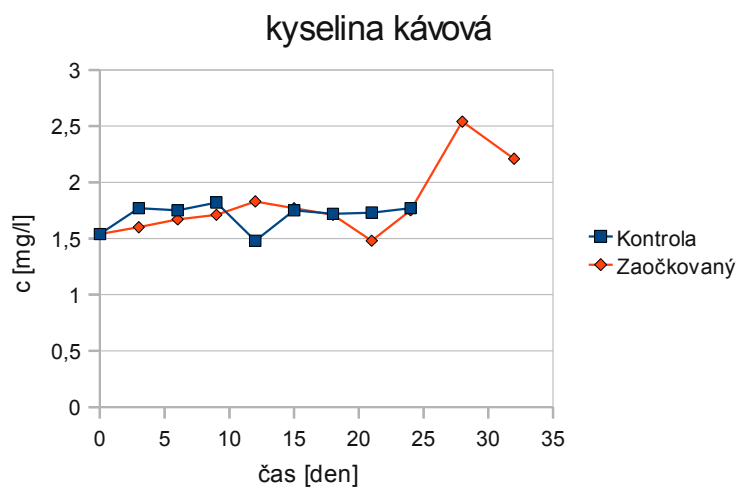
PŘÍLOHA P 1: GRAFICKÉ ZNÁZORNĚNÍ VÝVOJE KONCENTRACE ANTIOXIDANTŮ V ODRŮDĚ CABERNET MORAVIA OD VINAŘE Č.1



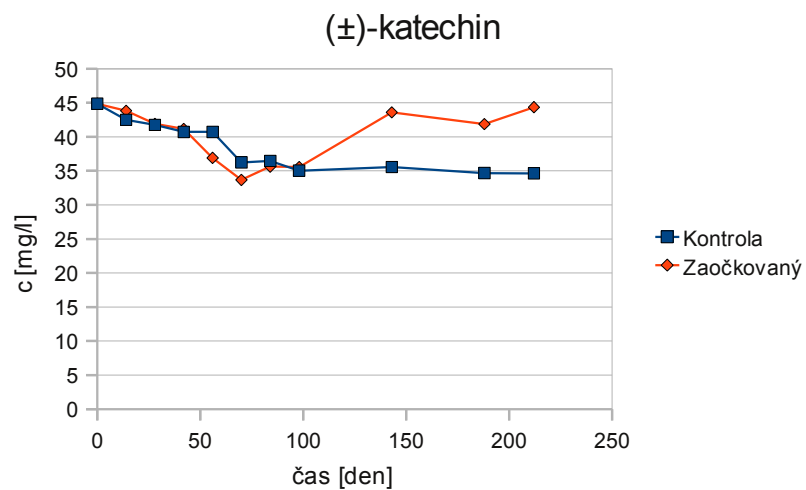
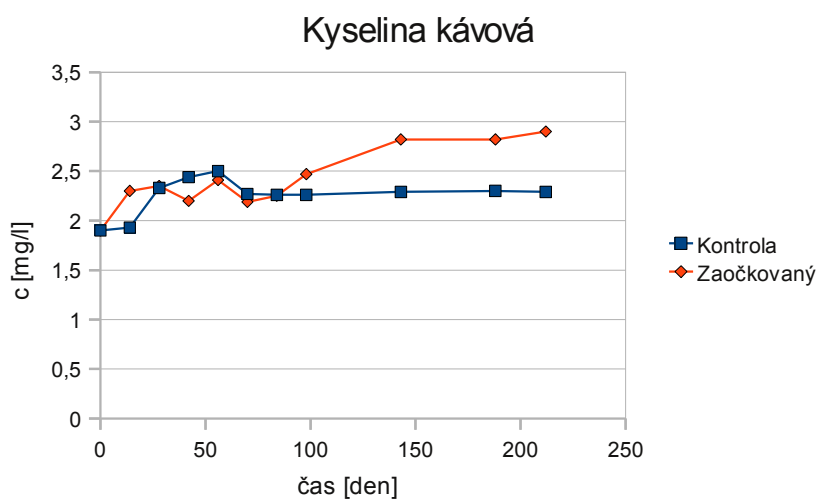
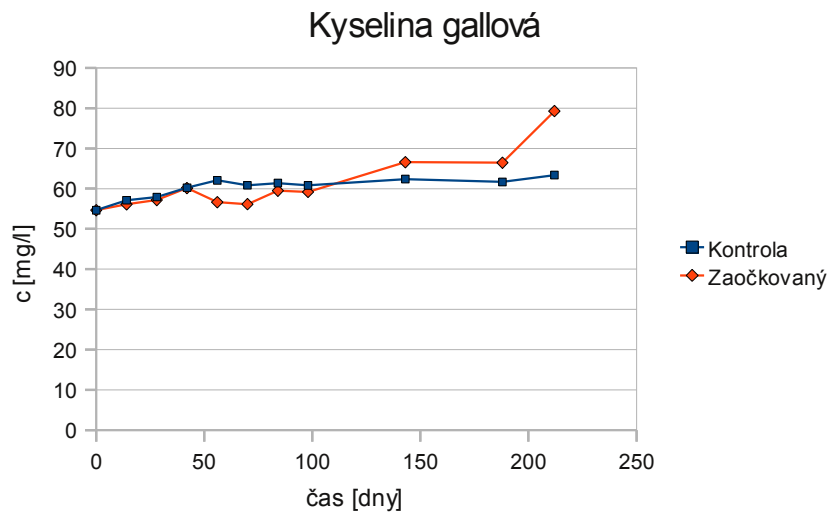
(-)-epikatechin



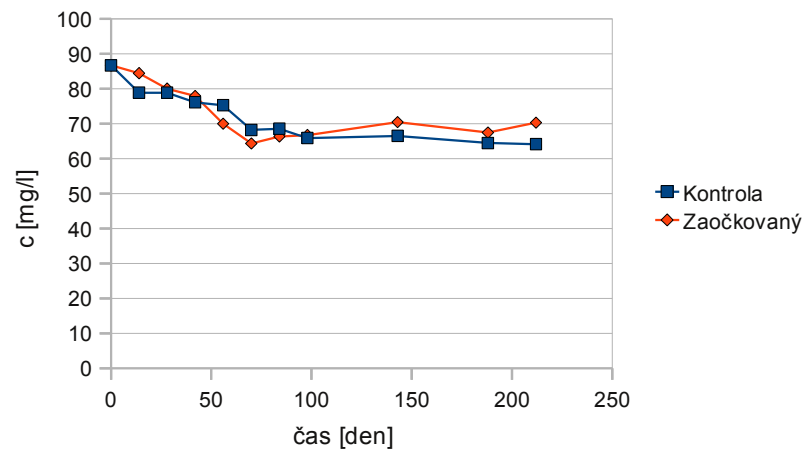
PŘÍLOHA P 2: GRAFICKÉ ZNÁZORNĚNÍ VÝVOJE KONCENTRACE ANTIOXIDANTŮ V ODRŮDĚ ZWEIGELTREBE OD VINAŘE Č.1



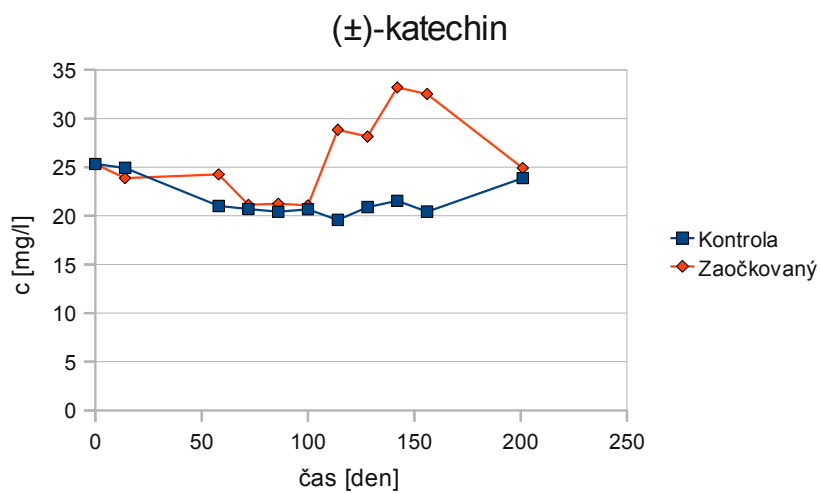
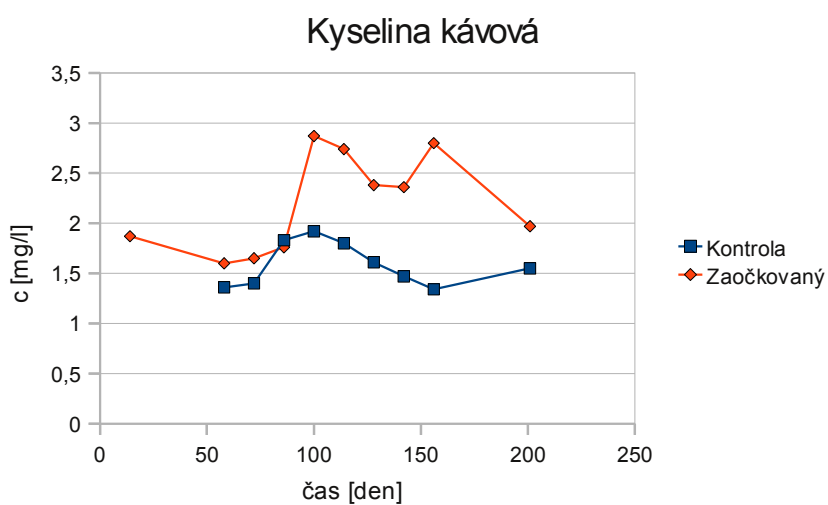
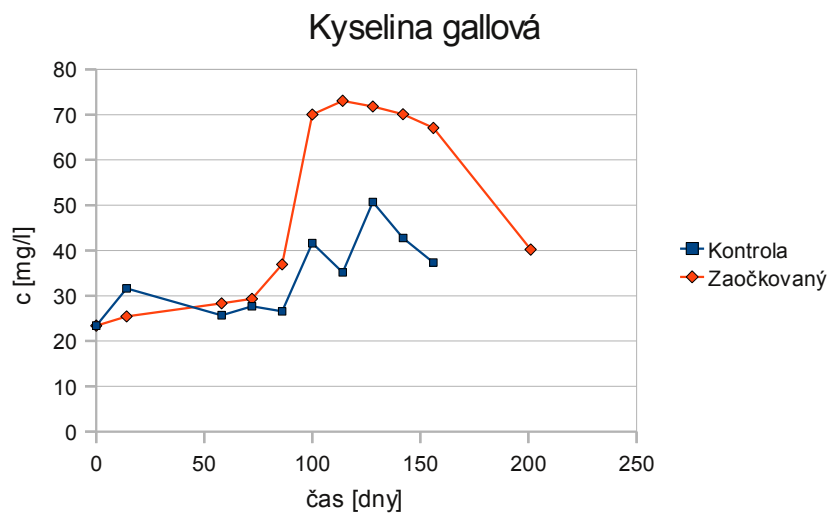
PŘÍLOHA P 3: GRAFICKÉ ZNÁZORNĚNÍ VÝVOJE KONCENTRACE ANTIOXIDANTŮ V ODRŮDĚ CABERNET MORAVIA OD VINAŘE Č.2



(-)-epikatechin



PŘÍLOHA P 4: GRAFICKÉ ZNÁZORNĚNÍ VÝVOJE KONCENTRACE ANTIOXIDANTŮ V ODRŮDĚ ZWEIGELTREBE OD VINAŘE Č.2



(-)-epikatechin

