

**Mendelova univerzita v Brně**

Zahradnická fakulta v Lednici



**Používané metody pro stanovení termolabilních  
bílkovin v procesu výroby vína a jejich srovnání**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Michal Kumšta

Vypracoval:

Bc. Radomír Hodeček

Lednice 2016

### Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: **Používané metody pro stanovení termolabilních bílkovin v procesu výroby vína a jejich srovnání** vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Lednici dne: 9.5.2016

podpis: Modřicek



# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatel : **Bc. Radomír Hodeček**

Studijní program: Zahradnické inženýrství

Obor: Řízení zahradnických technologií

Název tématu: **Používané metody pro stanovení termolabilních bílkovin v procesu výroby vína a jejich srovnání**

Rozsah práce: 60 stran textu, schémat, obrázků a příloh

Zásady pro vypracování:

1. Prostudujte literaturu týkající se termolabilních bílkovin, jejich vlivu na koloidní stabilitu vína a metod jejich stanovení.
2. V nestabilizovaných vínech stanovte různými metodami obsah bílkovin.
3. Získané výsledky vyhodnoťte z hlediska vhodnosti jednotlivých metod pro praxi.



Seznam odborné literatury:

1. BRANCO, J M. – RIBÉREAU-GAYON, P. Handbook of enology. : The chemistry of wine stabilization and treatments. volume 2. Chichester, West Sussex, England. 2006. ISBN 97804700103962, 97804700103722. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/0470010398>.
2. RIBÉREAU-GAYON, P. – BRANCO, J M. Handbook of enology. : The microbiology of wine and vinifications. volume 1. Chichester, West Sussex, England. 2006. ISBN 97804700103651, 97804700103411. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/0470010363>.
3. STEIDL, R. – SCHÖDL, H. a kol. *Sklepní hospodářství*. 1. vyd. Valtice: Národní salon vín, 2002. 307 s. ISBN 80-903201-0-4.

Datum zadání diplomové práce: prosinec 2014

Termín odevzdání diplomové práce: květen 2016

L. S.

**Bc. Radomír Hodeček**

Autor práce

**Ing. Michal Kumšta**

Vedoucí práce

**doc. Ing. Mojmir Baron, Ph.D.**

Vedoucí ústavu



**prof. Ing. Robert Pokluda, Ph.D.**

Děkan ZF MENDELU

**Poděkování:**

Tímto bych chtěl poděkovat především přítelkyni a rodině za pomoc, trpělivost a podporu, bez které by tato práce nemohla vzniknout. Dále bych chtěl poděkovat všem, kteří mi pomohli cennými radami, připomínkami a odborným vedením při vypracování této práce.

Zvláštní poděkování patří především Ing. Michalu Kumštovi za odborné vedení a Ústavu vinohradnictví a vinařství.

## Obsah

1	Úvod.....	10
2	Literární přehled .....	12
2.1	Bílkoviny .....	12
2.2	Vznik bílkovin.....	14
2.2.1	Vznik zákalu.....	15
2.2.2	Vliv macerace na obsah termolabilních proteinů.....	15
2.2.3	Vliv bílkovin na koloidní stabilitu vína .....	17
2.3	Metody stanovení .....	20
2.3.1	Tepelné testy .....	20
2.3.2	Kyselinové testy .....	23
2.3.3	Taninový test.....	25
2.3.4	Etanolvý test.....	25
2.3.5	Speciální testy .....	25
2.3.6	Přístrojové stanovení.....	28
2.3.7	Vybrané elektroforetické metody.....	30
2.3.8	Imunologické testy .....	32
3	Cíl práce.....	34
4	Experimentální část.....	35
4.1	Materiál.....	35
4.2	Metody.....	40
4.3	Vyhodnocení.....	45
4.4	Diskuze .....	51
5	Závěr .....	54
6	Souhrn.....	55
7	Resumé.....	56

8	Seznam použité literatury .....	57
9	Přílohy.....	63

## Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obr. 1 Dvoufázový mechanismus, kterým taniny srážejí proteiny	19
Obr. 2 Diagram flokulace hydrofilních koloidů	20
Obr. 3 Denaturace bílkovin	21
Obr. 4 Bílkovinný zákal	22
Obr. 5 Pěnová zkouška	22
Obr. 6 Bentotest	24
Obr. 7 Bradfordova metoda kalibrační řada	26
Obr. 8 Xanthoproteinová reakce	26
Obr. 9 Biuretová reakce	27
Obr. 10 Diagram biuretické reakce	27
Obr. 11 HPLC Rigol L-3000	29
Obr. 12 Vertikální polyakrylamidová gelová elektroforéza	31
Obr. 13 Horizontální elektroforéza	31
Obr. 14 Princip imunologických metod	33
Obr. 15 „Veltlínské zelené“	35
Obr. 16 „Cabernet Sauvignon“	36
Obr. 17 Schéma pokusu	40
Obr. 18 Turbidimetr Wissenschaftlich-Technische 550IR	42
Graf 1 Funkční rozdělení hlavních proteinů	14
Graf 2 Změny obsahů bílkovin v mošttech během zrání	16
Graf 3 Změny obsahu proteinů	17
Graf 4 Jodometrické stanovení oxidu siřičitého ve vínech	38
Graf 5 Zprůměrované naměřené hodnoty termolabilních bílkovin jednotlivými metodami u nevyčiřených	46
Graf 6 Zprůměrované naměřené hodnoty z pěnové zkoušky u nevyčiřených vín	48
Graf 7 Zprůměrované naměřené hodnoty termolabilních bílkovin z pěnové zkoušky u vyčiřených vín	48
Graf 8 Zprůměrované naměřené hodnoty termolabilních bílkovin jednotlivými metodami u vyčiřených vín	49
Graf 9 Časové znázornění délky jednotlivých testů i s přípravou pomocných roztoků	50



Graf 10 Zprůměrované směrodatné odchylky jednotlivých metod u vyčiřených i nevyčiřených vín	51
---	----

Tab. 1 Analytický rozbor FTIR analyzátozem	38
--	----

## **Seznam zkratek**

### ***Jednotkové***

NTU – nefelometrická turbidimetrická; jednotka určující množství zákalu  
kDa – kilodalton; jednotka atomové hmotnosti rovnající se 1000 daltonům  
i.p. – izoelektrický bod; hodnota pH roztoku v němž se amfion nepohybuje v elektrickém poli

### ***Proteinové***

VvTL1 – thaumatinu podobný protein

VvChiA – chitináza

F2/4JRU – thaumatinová isoforma

I/4L5H - thaumatinová isoforma

H2/4MBT - thaumatinová isoforma

# 1 Úvod

Termolabilní bílkoviny jsou neustálým problémem ve všech vinařstvích zabývajících se výrobou bílých a rosé vín. Problém s termolabilními bílkovinami nastává hlavně v období před lahfováním vín. Obsah termolabilních bílkovin ve vínech je závislý především na průběhu počasí při vývoji hroznů a na rozsahu napadení révy a hroznů patogeny v období od zaměkání hroznů po jejich sklizeň. Také má velký vliv i odrůda, zralost hroznů a samotné předfermentační zpracování hroznů.

Stanovení přesného obsahu termolabilních bílkovin před lahfováním vína je velice důležitým krokem každého vinaře. Špatné stanovení může vést k pozdější tvorbě bílkovinného zákalu v lahvi a může mít negativní dopad na prodejnost takto zakaleného vína. Nebo v opačném důsledku může dojít k přečiření vína, při kterém může dojít k organoleptickému defektu samotného vína, jakožto ztrátě aromatických vlastností vína, zeštíhlení chuťové struktury vína či odstranění barevnosti vína. Výsledné víno se tak může stát fádním. U menších vinařství pravidelně dochází spíše k přečiření vín, u větších vinařství je čiření závislé na laboratorních rozbořech z akreditovaných laboratoří a vína jsou tak čiřena dle výsledků získaných z laboratorních rozborů. V případě přečiření moštu bentonitem dochází k odstranění částic způsobujících turbiditu nebo také kalnost moštu. To znamená, že vzniká nedostatečný kvasný povrch pro kvasinky a s nízkou turbiditou jde ruku v ruce i velmi nízká hodnota asimilovatelného dusíku v moštu. Tyto dva faktory mají za následek zvýšenou koncentraci těkavých kyselin ve výsledném víně. Mošty s nízkou turbiditou se rozkvášejí mnohem pomaleji a kvašení probíhá o mnoho delší dobu než u moštů, které jsou zakalené. U moštů, které mají zase vysokou kalnost, vzniká vyšší množství sirnatých sloučenin a sirovodíku. Příliš vysoká turbidita vede také k rychlému prokvašení moštu na víno a příliš nízká turbidita k oddálení kvašení moštu. V odborných publikacích se uvádí, že optimální kalnost moštů před kvašením se pohybuje mezi 100 – 250 NTU.

Problém přesného stanovení obsahu termolabilních bílkovin nastává v případě, že jsou termolabilní bílkoviny, jakožto koloidní částice, chráněny polysacharidy. Polysacharidy mohou tvořit jejich ochranný obal a bránit jejich flokulaci. Další komplikace může nastat v případě, že se bílkoviny nacházejí v blízkosti

izoelektrického bodu, díky kterému jsou svým nábojem neutrální a nereagují tak s žádným čířidlem.

V dnešní době je známá celá řada metod ke stanovení obsahu termolabilních bílkovin a proto je důležité porovnat tyto metody a určit metody, které jsou nejvhodnější ke stanovení obsahu termolabilních bílkovin před lahvováním vín, a to hlavně z hlediska rychlosti měření a přesnosti měření obsahu termolabilních bílkovin.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Bílkoviny

Bílkoviny nebo také proteiny, jsou základní strukturní a funkční jednotky všech živých organismů. Jedná se o makromolekuly o molekulové hmotnosti nad 10 000. Jsou složeny z jasně definovaného řetězce aminokyselin, které jsou spojeny peptidickými vazbami. Dle hodnoty pH mohou být proteiny pozitivně či negativně nabitě a mohou být také u izoelektrického bodu, tudíž neutrální. Sekvence aminokyselin v polypeptidickém řetězci určuje trojrozměrnou strukturu a prostorové uspořádání bílkoviny.

Červená vína na bílkovinné zákaly netrpí, protože termolabilní bílkoviny jsou vysráženy s taniny. Bílá a rosé vína ale mohou mít naopak proměnlivou koncentraci bílkovin až do několika set  $\text{mg.l}^{-1}$ , tyto bílkoviny pocházejí převážně z hroznů. Bílkoviny vyskytující se v moštu jsou známé svou nestabilitou a ovlivňováním čistoty bílých vín. Při jejich vysrážení se vytvoří bílkovinný zákal. V minulosti byl tento zákal spousta let zaměňován s měďnatým zákalem nebo s bílým zákalem. Obvykle se však bílkovinný zákal objevuje v lahvi, když dojde k jejímu skladování při vyšších teplotách a vyznačuje se kalností či vysrážením termolabilních bílkovin. Tento zákal může také vzniknout vyluhováním taninu z korku do vína. Vylučované bílkoviny jsou zodpovědné za hlavní problémy čirosti bílých a rosé lahvových vín.

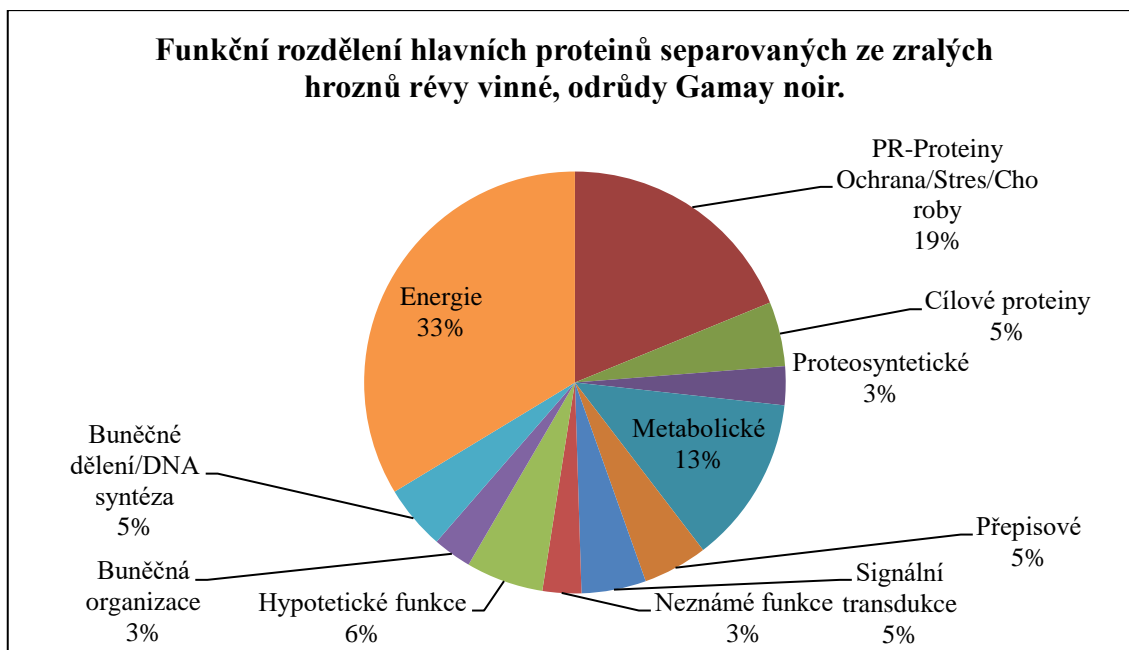
Pro prevenci před termolabilními bílkovinami ve vínech se k ošetření užívá bentonit. Bentonit patří k montmorillonickým půdám, které mají velkou roztažnost krystalické mřížky a dokážou tak navázat termolabilní bílkoviny z vína díky svému zápornému náboji a kladnému náboji bílkovin při pH vína. Následným stočením vína ze sedimentovaného bentonitu dojde i k odstranění části bílkovin. Nejdůležitější je však množství dávkovaného bentonitu. Při vysokých dávkách může docházet k přečiření vína a k negativním změnám ve víně. Při nízkých dávkách zase nemusí být odstraněna všechna termolabilní bílkovina a může tak dojít k její flokulaci v lahvi (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Vincenzi se svým týmem zjistili, že přidavek vhodného množství chitinu [poly(*N*-acetyl-1,4- $\beta$ -D-glucopyranosamine)] do vína umožňuje snížit množství tepelného zákalu až o 80 %, dále při výzkumu zjistil, že hlavní proteinová složka

odstraněná chitinem odpovídá chitináze hroznového původu a to chitináze IV. třídy, která nese doménu vázající chitin (VINCENZI et al., 2005).

Waters se svým týmem zjistili, že konkrétní typ proteinů, jakož i jejich izoelektrický bod, stupeň glykosylace a citlivost na teplo, se liší v závislosti na hroznech a odrůdě. Proteiny citlivé na teplo zůstávají ve víně i po prokvašení v konstantních koncentracích a jsou odolné vůči proteázové aktivitě kvasinek. Také zjistil, že hlavní proteiny tvořící zákaly ve víně z „Vitis vinifera cv. Muscat Gordo Blanc“ použitím polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS-PAGE) jsou proteiny o molekulové hmotnosti 24 – 32 kDa a v roce 1996 Waters se svým týmem také zjistil, analýzou aminokyselinové sekvence, že jsou tyto proteiny podobné proteinům thaumatinu 1 (VvTL1) a chitináze (VvChiA), (WATERS et al., 1991, 1992 a 1996). Esteruelas se svým týmem tuto teorii potvrdil, ačkoliv udává jiné molekulové hmotnosti a to látky podobné thaumatinu s molekulovou hmotností 18 – 21 kDa a chitinázy s molekulovou hmotností 22 – 25 kDa (ESTERUELAS et al., 2009). Marangon se svým týmem zpřesnil informace ohledně flokulujících isoform thetaumatinu podobných proteinů. Jedná se o tři isoformy patřící do dvou různých tříd, a to F2/4JRU, což je thaumatinu podobný protein, který je tepelně nestabilní. Protein I/4L5H a H2/4MBT je VVTL1 (MARANGON et al., 2014). Šotkovský uvádí, že thaumatinu podobné proteiny a chitinázy II. třídy s molekulovou hmotností 26 kDa a endochitinázy jsou potravinové alergeny (ŠOTKOVSKÝ, 2012).

Jako alternativa pro odstraňování termolabilních bílkovin místo bentonitu se zdá být nejvhodnější přidávání proteolytických enzymů v kombinaci s krátkým ohřevem vína pro vyvolání denaturace PR proteinů (WATERS et al., 2005). V Grafu 1 můžeme vidět zprůměrované procentuelní koncentrace vinných proteinů obsažených ve zralých hroznech révy vinné ze zkoumané odrůdy „Gamay noir“, dle jejich funkčního rozdělení. Tyto informace byly získány 2-D elektroforézou (3 – 10 nl, 10%) a identifikovány MALDI-TOF PMF (SARRY et al., 2004).



**Graf 1** Funkční rozdělení hlavních proteinů separovaných ze zralých hroznů révy vinné, odrůdy „Gamay noir“ (SARRY et al., 2004). Graf byl pozměněn.

## 2.2 Vznik bílkovin

Hrozen v bylinných fázích má nízkou a stálou proteázovou aktivitu, která se při dozrávání zvyšuje. Při dozrávání hroznů probíhá aktivní proteosyntéza, při které koncentrace rozpustných proteinů dosahuje svého maxima před úplnou zralostí a ke konci zrání se zmenšuje (GIRIBALDI et al., 2007) a (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Salzman se svým týmem uvádí, že thaumatinu podobné proteiny i chitináza vznikají při vyzrání hroznů ve stejný čas jako akumulace cukrů (SALZMAN et al., 1998).

Koncentrace proteinů se v hroznové šťávě může pohybovat od 10 do 500 mg.l<sup>-1</sup> (MARANGON et al., 2014).

Zdravá hroznová šťáva má poměrně málo proteázové aktivity, asi 30 %. Koncentrace vysokomolekulárních proteinů souvisí s buněčnou stěnou, je vysoká od začátku vývoje a zvyšuje se v průběhu zrání. V moštu často proteiny představují 50 % celkového dusíku. Proteázy jsou vázány na buněčnou strukturu a proteázová aktivita se nejvíce vyskytuje v dužině.

Při výrobě bílých vín a rosé vín se část proteinů, které jsou nerozpustné, odstraní během samočištění mladého vína. Další část nerozpustných proteinů hydrolyzují endogenní hroznové proteázy do rozpustné formy, která je více přístupná kvasinkám

během kvašení. Při této hydrolýze se štěpí peptidické vazby v proteinech, které se vyskytují mezi dvěma aminokyselinami.

Při napadení hroznů „*Botrytis cinerea*“ dochází k degradaci hroznových proteinů pomocí houbových proteáz. „*Botrytis cinerea*“ pak syntetizuje metabolické proteiny nezbytné pro růst. Hrozny se tímto stávají bohaté na exocellulární houbové proteiny, takzvané

PR (pathogenesis - related) proteiny (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Avšak PR proteiny nemusejí být vytvořeny v rostlině jen („*Botrytis cinerea*“) biotickým faktorem, ale i abiotickým faktorem způsobujícím stres rostliny (MARANGON et al., 2014).

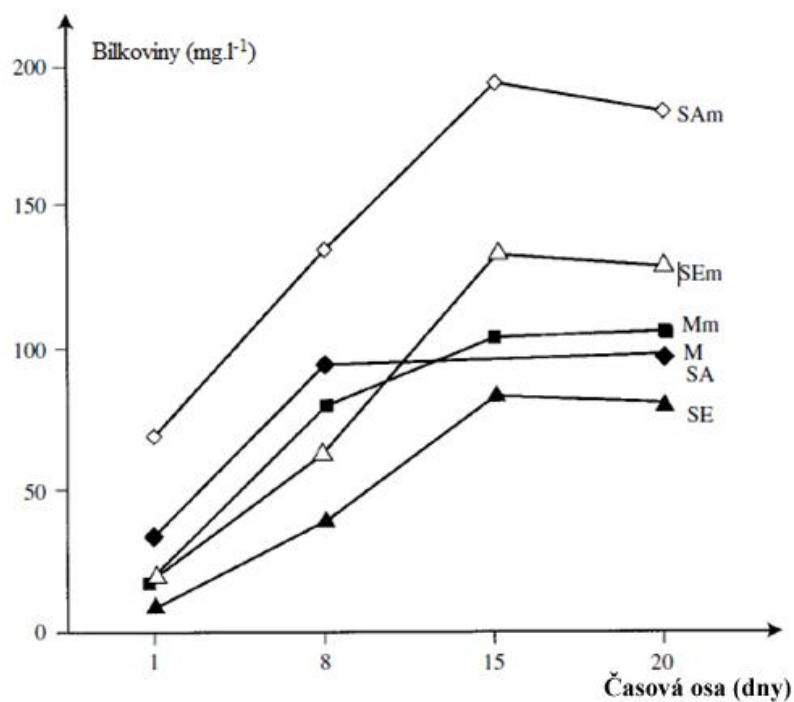
### **2.2.1 *Vznik zákalu***

Flokulace vyžaduje odstranění dvou stabilizačních faktorů, a to náboje a hydratace. Komplex tanin-protein se vytvoří v přítomnosti taninu. Tento komplex je podobný negativnímu hydrofobnímu koloidu, kdy dochází k flokulaci působením kationtu. Na stejném principu je i ohřev na teplotu 70 – 80 °C, při dostatečně dlouhé době může dojít k vysrážení všech termolabilních bílkovin. V případě rychlého ohřevu se zákal objeví pouze při zchlazení. Ohřev denaturuje bílkoviny hydrolýzou, následná flokulace probíhá díky taninu či kationtu, který bílkovina přijme. Zákaly tvořené proteiny se liší v závislosti na izoelektrickém bodě. Bílkoviny nad i.p. 7 tvoří kompaktní sraženiny, zatímco bílkoviny s i.p. 5,94 – 4,65 tvoří vločky a pod 4,65 tvoří pouze zákal. Pokud dojde k zahřívání směsi těchto frakcí, dojde k tvorbě kompaktní sraženiny (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Chagas se svým týmem uvádí, že přidavek SO<sub>2</sub> do moštu či vína vede k štěpení disulfidických vazeb uvnitř proteinů, ke zhoršení thiol-disulfidové výměny během proteinových interakcí a vede ke tvorbě nových interproteinových disulfidických vazeb, které jsou v konečném důsledku zodpovědné za agregaci proteinů ve víně vlivem nárůstu nukleačního kinetického modelu. Přidavek SO<sub>2</sub> do vína před lahvováním může vést k tvorbě nestabilních bílkovin v nalahvovaném víně. V přílohovém obrázku č. 1 vidíme výsledky pokusu provedeného Chagasem a jeho týmem (CHAGAS et al., 2016).

### **2.2.2 *Vliv macerace na obsah termolabilních proteinů***

Při maceraci hroznů bez třapin se dle vyžrállosti hroznů zvyšuje obsah termolabilních bílkovin. Zatímco při maceraci hroznů s vyžrálou třapinou dojde ke

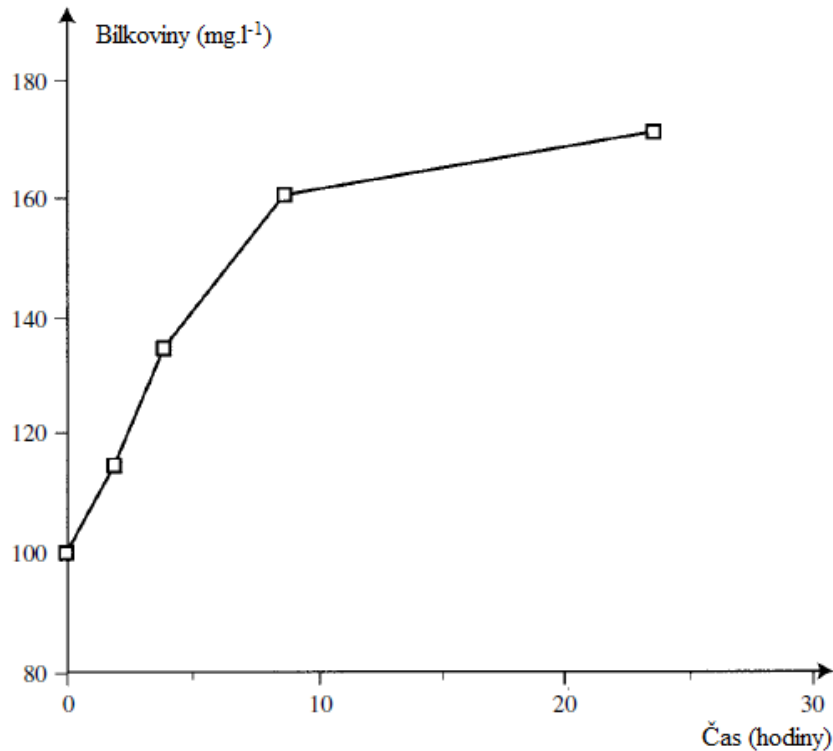
snížení obsahu termolabilních bílkovin vlivem vymacerování taninů z třepiny. Nejnížší obsahy bílkovin vykazují mošty, které vznikly vylisováním celých hroznů ihned po sběru, bez mletí a odstopkování. Tyto fakty můžeme pozorovat na Graf 2 a 3 (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).



Graf 2 Změny obsahů bílkovin v moštích během zrání související s odrůdou a metodou zpracování.

SE, Semillon okamžité lisování; SA, Sauvignon Blanc okamžité lisování; M, Muškát okamžité lisování; SEm, Semillon s macerací na slupkách; SAm, Sauvignon Blanc s macerací na slupkách; Mm, Muškát s macerací na slupkách. Graf byl pozměněn. Zdroj: (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).





**Graf 3** Změny obsahu proteinů u odrůdy Sauvignon Blanc v moštu během macerace na slupkách před zahájením fermentace. Graf byl pozměněn. Zdroj: (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

### 2.2.3 Vliv bílkovin na koloidní stabilitu vína

Ačkoliv se proteiny ve víně vyskytují jen ve velmi malém množství, mají zásadní význam pro koloidní stabilitu a čírost vína (HSU a HEATHERBELL, 1987) a (SAUVAGE et al., 2010).

Čírost vína je základ kvality pro spotřebitele, zejména u bílých a rosé vín v čiré skleněné lahvi. Částice, zákal či opar v lahvi nekazí jen prezentaci vína, ale mají také vliv na jeho chuť (TABILO-MUNIZAGA et al., 2014). Mladé víno má velmi vysoký obsah částic skládajících se z kvasinek, vinných kalů a jiných hroznových frakcí. Čistoty vína je dosaženo postupným usazováním a stáčením pro odstranění pevných látek. Rychlejší postupy jako číření, filtrace či odstředování mohou být také použity. U vína musíme udržet jeho jasnost i v době během stárnutí a skladování, bez ohledu na teplotní podmínky. Cílem je získat čírost a stabilitu pomocí vhodných metod.

Koloidy vznikají za podmínek, že částice rostou na velikosti, což vede ke flokulaci a následné sedimentaci těchto částic. Flokulace je stabilizující proces při operacích k eliminaci neviditelných a nestabilních částic. Tento proces má také projasňovací vlastnosti v případě, že dojde k reakci s částicemi, které jsou odpovědné za zákal.

Vinné zákaly jsou způsobeny přítomností částic ve vínech. Tyto částice některé světelné paprsky pohltí a jiné rozptýlí do různých směrů. Proto se nám zdá víno zakalené v různých intenzitách. Těžké zákaly je možné snadno identifikovat přímým pohledem přes víno, zatímco lehké zákaly jsou hůře identifikovatelné (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Při shlukování částic míra zákalu narůstá a při dosažení velikosti částic 100  $\mu\text{m}$  se zákal stává viditelným. Zákal v důsledku rozptylu světla je nazýván také jako Tyndallův efekt. Tento zákal je měřitelný turbidimetricky v jednotkách NTU nebo také nefelometrických turbidimetrických jednotkách (KVÍTEK et al., 2007). Koloidní roztok je složený z malých pevných částic rozptýlených v kapalině a udržovaných soustavou sil, které brání jejich agregaci a flokulaci.

Máme dva různé typy koloidů, a to asociativní koloidy a lyofilní (makromolekulové) koloidy (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Tyto koloidy mohou být rozlišeny dle jejich vlastností nebo jejich složení

Asociativní, také známé jako micelární koloidy, jsou tvořeny agregáty či částicemi skládajících se z velkého počtu jednoduchých molekul držených pohromadě fyzikálními silami, nikoliv kovalentními silami. Asociativní koloidy představují především kondenzované fenoly a koloidní barviva a mají hydrofobní charakter.

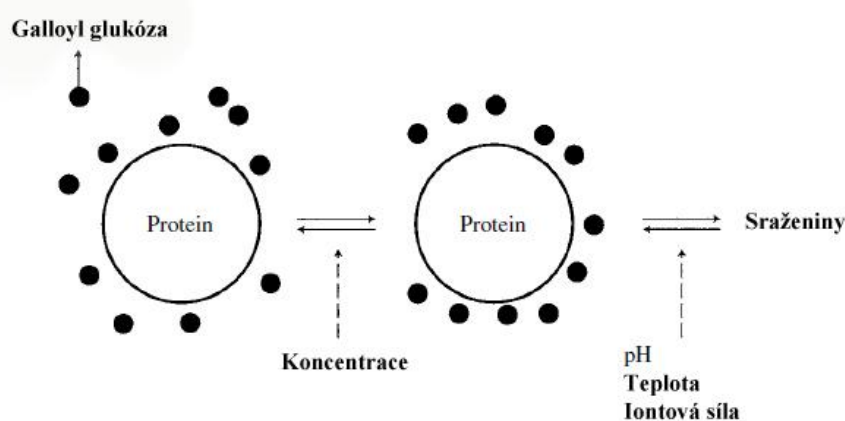
Makromolekulové koloidy jsou složeny z makromolekul jako polysacharidy a bílkoviny. Tyto koloidy jsou spojeny pouze kovalentními chemickými vazbami a jsou hydrofilní, takže snadno rozpustné ve vodě. Tuto vlastnost provádí hydratace, což je druhý stabilizační prvek. Také dokážou částečně odpuzovat elektrické náboje. Polysacharidy mohou dokonce vytvářet stabilitu sdružených koloidů a ochránit je před elektrolyty. Jsou známy jako ochranné koloidy (KVÍTEK et al., 2007).

Flokulace proteinů je používána k čiření vína. Bílkoviny dokážou být neutrálně nabitě v blízkosti izoelektrického bodu. V roztoku s hodnotou  $\text{pH} < \text{izoelektrický bod}$ , mají alkalické funkce, jimiž jsou neutralizovány a disociovány. Tím dávají přebytek kladného náboje. V roztoku s  $\text{pH} > \text{izoelektrický bod}$  jsou záporně nabitě. Tuto skutečnost, může vyvolat enzym lakáza, který je produkovaný „*Botrytis Cinerea*“. Jeho izoelektrický bod v blízkosti 2,5 je zodpovědný za jeho stabilitu. Bílkovinné koloidy ve zdravém víně mají kladný náboj.

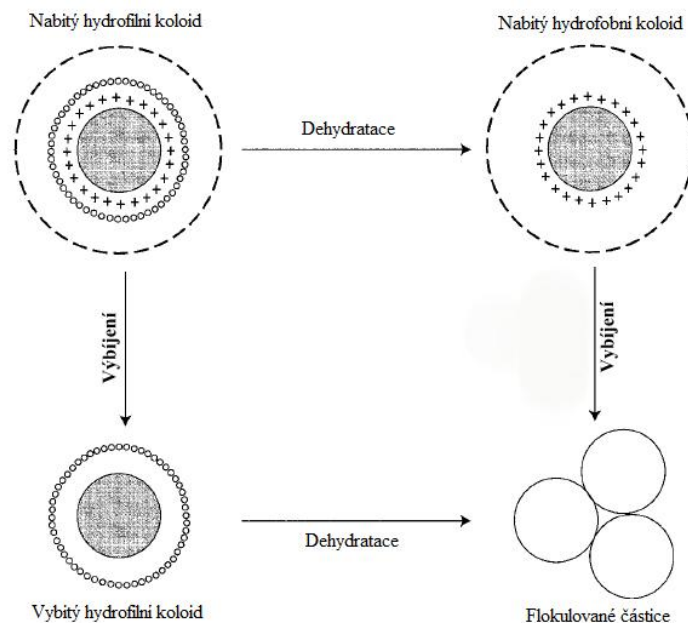
Síly působící na koloidní stabilitu jsou dvojího typu. První, tzv. Van der Waalsovy síly, jsou přímo úměrné průměru částic a nepřímo úměrné vzdálenosti mezi částicemi. Dokážou vyvážit síly způsobené tepelným působením, pokud je vzdálenost mezi částicemi menší než jejich poloměr. Tyto síly podporují přitažlivost koloidních

částic. Stabilita koloidního roztoku vyžaduje vyvážení přitažlivých sil silami odpudivými, které jsou druhým typem sil působících ve víně. Zejména se jedná o elektrostatické interakce působící v důsledku povrchového náboje na straně částice. Tyto náboje vytvářejí elektrostatický potenciál okolo částic, a tím udržují částice od sebe oddělené. Bylo prokázáno, že rozsah elektrostatických sil klesá se zvyšující se koncentrací solí ve víně. Sacharidové polymery mohou působit jako ochranné pro koloidy nebo je také mohou destabilizovat a způsobit jejich vysrážení. Náboj a hydratace jsou stabilizačními prvky koloidů ve víně. Obecně platí, že vysrážení bílkovin vyžaduje přítomnost alkoholu, taninu či tepla, což můžeme pozorovat na Obr. 1. Pomocí těchto činidel dojde k denaturaci proteinu a protein se stává hydrofobním koloidem, který může být vyvločkován solemi. Velké množství elektrolytu, například síranu amoného, může stačit k transformaci proteinu na hydrofobní a vést k jeho vyvločkování. Můžeme vidět na Obr. 2.

Flokulace částic je velice důležitá při výrobě vína, protože při ní probíhá čiření vína. Když protein flokuluje s čiřícím prostředkem, částice v suspenzi a koloidní částice jsou eliminovány v důsledku vzájemné flokulace, stává se víno stabilním a vyčiřeným ve stejný čas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).



**Obr. 1** Dvoufázový mechanismus, kterým taniny srážejí proteiny (Galloyl glukózu). Vliv fyzikálně-chemických podmínek. Obrázek byl pozměněn. Zdroj: (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).



**Obr. 2 Diagram flokulace hydrofilních koloidů eliminací dvou stabilizačních faktorů, a to elektrického náboje a hydratace. Obrázek byl pozměněn. Zdroj: (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).**

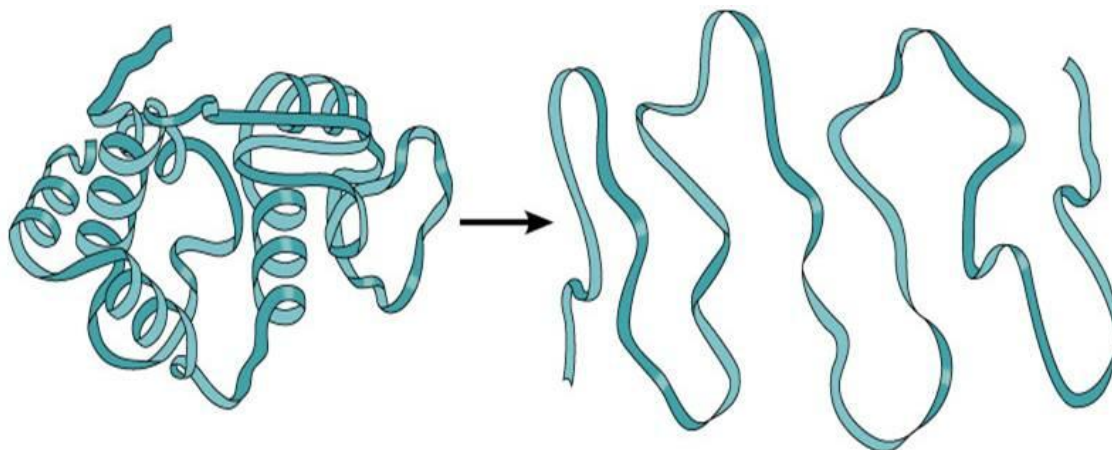
## 2.3 Metody stanovení

Mezi nejpoužívanější metody se řadí metody s využitím chemických látek, a to především kyselin, solí a taninů. Tepelné záření, které může být kombinované s užitím chemických látek. Laboratorní technika, jako například FPLC či HPLC, dokáže změřit pouze zvolené typy proteinů nikoliv celkovou škálu termolabilních bílkovin. Pro přesnost těchto pokusů by testované vzorky měly být již čiré, z důvodu eliminace chyb vzniklých při měření.

### 2.3.1 Tepelné testy

Denaturované bílkoviny vytvářejí amorfni sraženiny, které následně sedimentují na dno lahve (FERREIRA et al., 2001). Koagulace termolabilních bílkovin je ovlivněna množstvím přijatého tepla a délkou tepelného působení na bílkovinu (ZOECKLEIN et al., 1990). Tepelným působením mohou být vysráženy všechny bílkoviny ve víně. Tak můžeme určit různé stupně stability s ohledem na bílkoviny. Například při zahřívání vína při teplotě 40 °C po dobu 24 hodin se vysráží asi 40 % bílkovin ze vzorku, zatímco při teplotě 60 °C se vysráží 95-100 % bílkovin (POCOCK a RANKINE, 1973).

Různí autoři uvádějí různé teplotní působení a různou reakční dobu, proto jsem pro literární i pokusnou část zvolil co možná nejrepresentativnější metody. Vzniklý zákal se měří nefelometricky či turbidimetricky.



**Obr. 3 Denaturace bílkovin. Zdroj:**  
[http://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty2/vseo/files/58/5396.jpg](http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/58/5396.jpg).

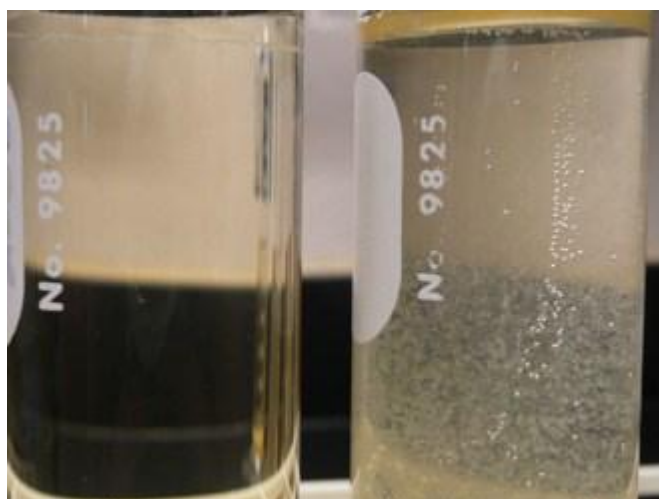
### ***Rychlé zahřátí***

Sterilně vyfiltrovaný vzorek vína zahřejeme na 90 °C po dobu 1 hodiny ve vodní lázni a následně zchladíme na 4 °C po dobu 6 hodin v ledničce. Poté ponecháme vzorek při pokojové teplotě asi 20 °C (SARMENTO et al., 2000). ESTERUELAS se svým týmem v článku píše, že tento způsob testování se zdá být nejpodobnější přírodnímu vysrážení z hlediska chemického složení sraženiny, a proto jej hodnotí jako nejvhodnější metodu pro zkoušku bílkovinné stability (ESTERUELAS et al., 2009).

### ***Pomalé zahřívání***

Sterilně vyfiltrovaný vzorek vína zahřejeme na 60 °C po dobu 4 dnů a následně zchladíme na 4 °C po dobu 6 hodin. Poté ponecháme vzorek při pokojové teplotě asi 20 °C.

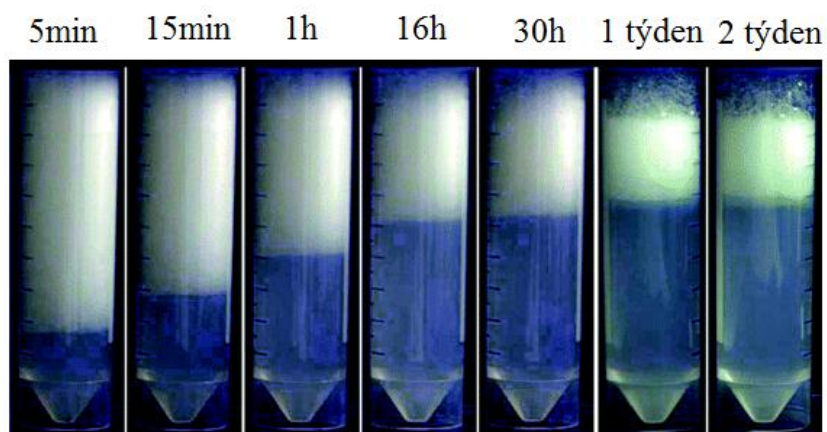
Zákal se měří oproti sterilně vyfiltrovanému slepému vzorku neošetřeného, přefiltrovaného vína. Před měřením se vzorek musí dobře promíchat, aby nedošlo k sedimentaci. Měření probíhá turbidimetrickou metodou (SARMENTO et al., 2000).



Obr. 4 Bílkovinný zákal (SMITH, 2012).

### *Pěnová zkouška*

10 ml čirého vína zahřejeme na 80 °C. Následně víno zchladíme na laboratorní teplotu a pořádně protřepeme. V případě, že vytvořená pěna přetrvá dobu 1 minuty, hrozí vypadávání termolabilních bílkovin (BALÍK, 2006). Vína bohatá na bílkoviny mají intenzivní tvorbu pěny, která se může udržet až několik hodin (FARKAŠ, 1983). Tento test je vhodné používat po vyčiření vína před lahvováním.



Obr. 5 Pěnová zkouška. Obrázek byl pozměněn Zdroj: <http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/Articleimage/2011/SM/c1sm05374d/c1sm05374d-f4.gif>

### *Přírodní vysrážení*

U vína, které je nestabilní na termolabilní bílkoviny, skladovaného při pokojové teplotě 13 – 23 °C, v hermeticky uzavřené nádobě po delší dobu než jeden rok, dojde v průběhu skladování k samovolnému vytvoření bílkovinného zákalu, vysrážením termolabilních bílkovin (SARMENTO et. al., 2000).

### **2.3.2 Kyselinové testy**

Berg a Akiyoshi (1961) píše, že přítomnost jiných nestabilních látek než bílkovinné povahy nemá vliv na kvalitu testu.

#### ***Test kyselinou trichloroctovou***

Do 10 ml sterilně vyfiltrovaného vína přidáme 1 ml 55% trichloroctové kyseliny. Vzorek s trichloroctovou kyselinou přivedeme k varu ve vodní lázni po dobu 2 minut. V dalším kroku zkoumaný vzorek necháme reagovat při teplotě místnosti po dobu 15 minut. Následně můžeme provést vyhodnocení (BERG a AKIYOSHI, 1961).

#### ***Test kyselinou fosfomolybdenovou***

Jedná se o kvalitativní zkoušku. Napipetujeme 20 ml čirého vína do kalibrované zkumavky, přidáme 1 ml 10% kyseliny fosfomolybdenové. Důkladně promícháme a ponecháme po dobu 20 hodin sedimentovat. Po reakční době se vzorek vína vyhodnotí odečtením výšky sraženiny v kalibrované zkumavce. Výška sraženiny ve zkumavce je úměrná množství termolabilních bílkovin ve víně. Při množství sraženiny do 0,3 ml je víno považováno za stabilní na bílkovinné zákaly a není potřeba přidavku čířící látky, bentonitu (FARKAŠ, 1983).

#### ***Test kyselinou sulfosalicylovou***

K testovanému vínu se přidá několik kapek 10% roztoku kyseliny sulfosalicylové (2-hydroxy-5-sulfobenzoové). Pokud víno obsahuje termolabilní bílkoviny, dojde ke tvorbě zákalu či sraženiny (VACEK a VALEŠOVÁ, 1992).

#### ***Test testovacím roztokem dle Farkaše***

Na roztok A se použije 1 g fosfomolybdenanu sodného, který se rozpustí ve 100 ml destilované vody. Následně se roztok okyselí HNO<sub>3</sub> na pH 2.

Na roztok B se použije 1 g wolframanu sodného, který se rozpustí také ve 100 ml destilované vody. Následně se provede okyselení jako u roztoku A na pH 2.

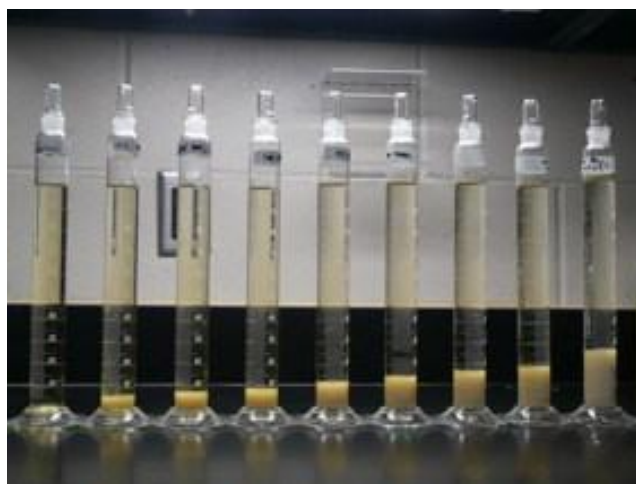
Tyto dva roztoky A+B se smíchají v poměru 1 : 1 a vznikne roztok C.

Pro testování se použije roztok C, a to tak, že na 15 ml vína se použijí 2 ml testovacího roztoku C. Pokud je výsledek negativní, víno zůstane po přidavku

roztoku C čiré, to znamená, že víno není náchylné na termolabilní bílkoviny. Pokud však dojde k zakalení, můžeme určit i stupeň náchylnosti na zákal a potřebné množství čířícího prostředku dle Farkaše (FARKAŠ, 1983).

### ***Bentotest***

Po celém světě dodávají různí výrobci na trh různé kombinace bentotestů založených na kyselinách. Většinou se jedná o kombinaci kyseliny fosfomolybdenové a kyseliny sírové, které jsou naředěné destilovanou vodou. Proces míchání s vínem se pohybuje v poměru 1:10, tedy 1 díl roztoku na 10 dílů vína. Následně se počká, až skončí reakční doba a provede se vyhodnocení vytvořeného bílkovinného zákalu, který vznikne denurací bílkoviny kyselinou (Bentotest reagent, 2010).



**Obr. 6 Bentotest (SMITH, 2012).**

### ***Vysolování bílkovin***

Do šesti kalibrovaných zkumavek přidáme pipetou po 5 ml testovaného vzorku. Následně přidáváme do první zkumavky několik krystalů síranu ammoného ( $\text{NH}_4$ ) $_2$ SO $_4$ , do druhé napipetujeme 2 ml chloridu sodného (NaCl). Do třetí zkumavky napipetujeme 2 ml chloridu draselného (KCl). Do čtvrté zkumavky napipetujeme 2 ml síranu sodného (Na $_2$ SO $_4$ ). Do páté napipetujeme 2 ml síranu hořečnatého (MgSO $_4$ ) a do šesté napipetujeme 2 ml acetonu (C $_3$ H $_6$ O). Vznikají sraženiny, které jsou zase rozpustné přidáním 5 ml destilované vody (VACEK a VALEŠOVÁ, 1992).



### **2.3.3 Taninový test**

Přidáním 0,5 – 2 g.l<sup>-1</sup> galického taninu do vína vznikne okamžitě viditelný zákal. Při tomto pokusu velice záleží na metodě separace taninu z dřeva. Jestli byl separován vodou, alkoholem nebo etherem. Při každém způsobu vznikne jiné množství turbidity. Někdy se také doporučuje tento test kombinovat s tepelným testem a to přidávkem 0,5 g.l<sup>-1</sup> taninu do vína s následným zahřátím vína ve vodní lázni na 80 °C po dobu 30 minut. V případě skladování nalahvovaného, špatně vyčiřené vína pod korkovým špuntem, může dojít k vyluhování taninu z korkového špuntu a k následné reakci taninu s termolabilní bílkovinou a ke vzniku bílkovinného oparu (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

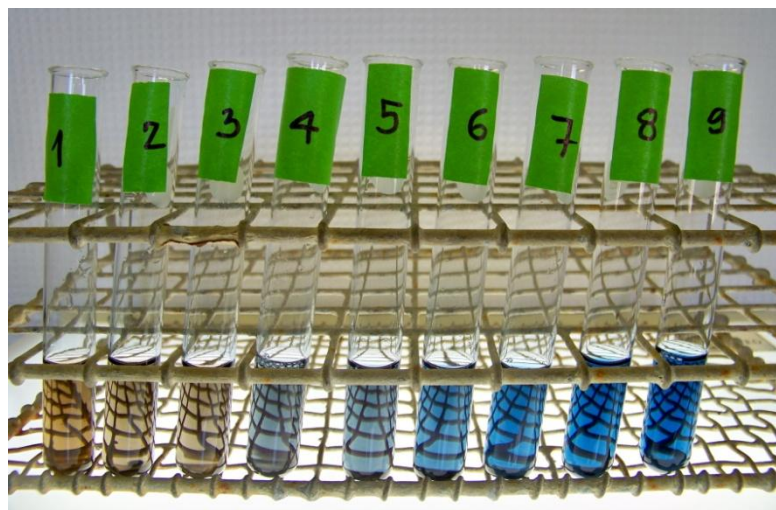
### **2.3.4 Etanolvý test**

Do uzavíratelné nádoby se napipetuje 5 ml čistého etanolu a 5 ml testovaného odplyněného sterilně vyfiltrovaného vína. Následně se nádobka hermeticky uzavře a při pokojové teplotě se nechá po dobu 2 hodin. Po reakční době vyhodnotíme vzniklý zákal (SARMENTO et al., 2000).

### **2.3.5 Speciální testy**

#### ***Bradfordova metoda***

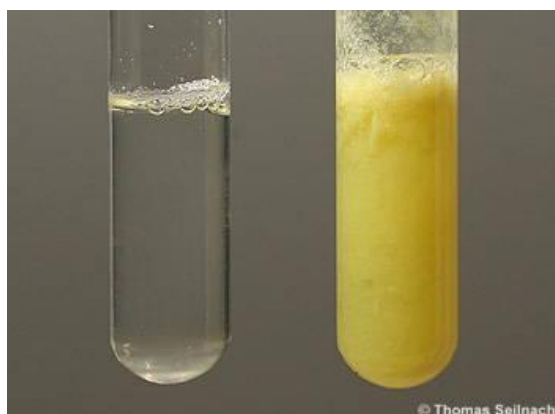
Lze stanovit celkový obsah proteinů pomocí modrého barviva zvaného Coomasse, nebo také Brilliant blue. V kyselém prostředí jsou červená barviva převedena na modré formy s navázáním tohoto barviva na protein. Tato změna se stanovuje při 595 nm na spektrofotometru (Cecil CE2021, Cambridge, England) po 5 minutách inkubace. Aniontově vázaná forma barviva má maximální absorpční spektrum na 595 nm. Kationtově nevázané formy jsou zelené nebo červené. Při navázání barviva na protein je stabilní modrá aniontová forma. Zvýšení absorpance při vlnové délce 595 nm je přímo úměrné množství navázaného barviva a také koncentraci proteinu přítomného ve vzorku. Autor uvádí, že na rozdíl od jiných proteinových testů je Bradfordův test méně citlivý na rušivé vlivy různých chemických látek, které mohou být přítomny ve zkoumaném vzorku (LIRA et al., 2015), (BRADFORD et al., 1976).



Obr. 7 Bradfordova metoda kalibrační řada (TAVORMINA, 2009).

### *Xantoproteinová reakce*

Koncentrovaná kyselina dusičná přidaná k roztoku bílkovin obsahujících aromatická jádra (fenylalanin, tyrosin, triptofan) vytvoří bílou sraženinu, která zahřátím žloutne. Vznikají žluté nitrolátky. Po přidavku amoniaku přechází žluté zbarvení na oranžové, po přidavku hydroxidu sodného na červeno hnědé. Do kalibrované laboratorní zkumavky přidáme pipetou 2 ml testovaného vzorku, následně přidáme 1 ml 45% kyseliny dusičné. Dojde ke tvorbě bílé sraženiny. Vzniklý roztok zahříváme nad plamenem kahanu do vzniku žluté sraženiny, která znázorňuje důkaz proteinů v roztoku (VACEK a VALEŠOVÁ, 1992).

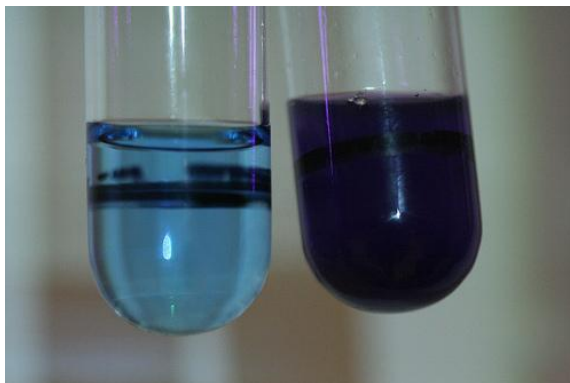


Obr. 8 Xantoproteinová reakce (SEILNACHT, 2016).

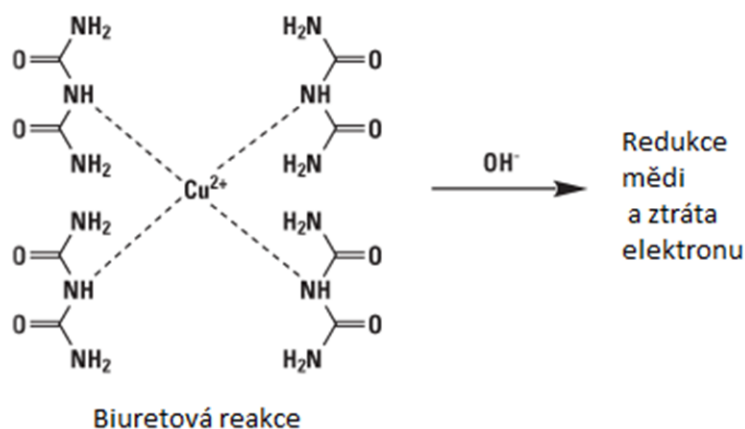
### *Biuretová reakce*

Tato reakce je založena na tvorbě komplexu mezi dvěma peptidickými vazbami a měďnatými ionty v alkalickém prostředí. Do zkumavky nalijeme 1 ml testovaného

vzorku, zalkalizujeme 1 ml 10% hydroxidu draselného (KOH), přidáme asi 5 kapek 1% roztoku síranu měďnatého (CuSO<sub>4</sub>). Při přítomnosti bílkovin se testovaný vzorek zbarví modře až modrofialově. Intenzita zbarvení je úměrná koncentraci bílkovin v roztoku a je měřitelná fotometricky proti slepému pokusu (VACEK a VALEŠOVÁ, 1992).



Obr. 9 Biuretová reakce. V levo negativní v pravo pozitivní. Zdroj: <https://classconnection.s3.amazonaws.com/203/flashcards/48203/jpg/biuret1341266703720.jpg>



Obr. 10 Diagram biuretické reakce. Původní obrázek byl pozměněn. Zdroj: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Images/integration/Biuret-Cu-Reduction.gif>

### *Lowryho metoda*

Jiskrně čiré víno zředíme fyziologickým roztokem 0,85% NaCl 1:9 v odměrné baňce o objemu 50 ml. Následně si nachystáme zkumavky s 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 ml bílkovinového standardu, který vznikne rozpuštěním 25 mg hovězího sérového albuminu v 50 ml fyziologického roztoku. Do samotné zkumavky napipetujeme 1 ml zředěného vína a k obsahům všech zkumavek dodáme 5 ml roztoku L, který je kombinací roztoku A = 2% roztok Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> v 0,1 mol.l<sup>-1</sup> roztoku NaOH

a roztok B = 0,5% roztok  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  v 1% roztoku vinanu sodného. Kombinace těchto roztoků A:B je v poměru 49:1. Důkladně promícháme a necháme 10 minut reagovat. Dále do všech zkumavek přidáme 0,5 ml Folinova činidla naředěného destilovanou vodou 1:2. Všechny zkumavky důkladně promícháme a necháme reagovat dalších 30 minut. Poté měříme absorbanci pomocí VIS- spektrofotometru v 10 mm kyvetě proti slepému vzorku při vlnové délce 720 nm. Vyhodnocení se provádí na základě naměřené lineární absorbanci, stupně ředění vína a koncentraci bílkovin. Celkový naměřený obsah bílkovin se vyjádří v g hovězího sérového albuminu v litru vína na jedno desetinné místo (BALÍK, 2006).

### ***Kjeldahlova metoda***

Tato metoda měří obsah dusíku obsaženého ve vzorku. Obsah proteinu se může přepočítat za předpokladu, že poměr proteinu k dusíku byl analyzován. Tuto metodu můžeme rozdělit do tří částí:

- 1) vyluhování látek v rozpouštědle za určitých podmínek
- 2) destilace
- 3) titrace

Při kroku č. 1 je organický dusík převedený na amonný ( $\text{NH}_4^+$ ) za přítomnosti katalyzátoru při teplotě kolem 370 °C. V druhé části je  $\text{NH}_4^+$  přeměněn za pomoci NaOH na  $\text{NH}_3^-$ , který je vydestilován. Tento  $\text{NH}_3^-$  je zachytáván na roztoku kyseliny borité. Následně se množství amoniakálního dusíku určí titračně se standardním roztokem kyseliny chlorovodíkové (HCl). Množství spotřebovaného činidla při titraci do prvních změn se odečítá od slepého pokusu. Tímto zjistíme jednotlivé spotřeby, které se následně přepočítávají na obsah proteinů (NIELSEN, 2010).

### ***2.3.6 Přístrojové stanovení***

Publikace uvádějí, že rozdíl mezi HPLC a FPLC je pouze v tlaku kolony, s kterým daný přístroj pracuje. Jinak při těchto metodách se dají sledovat pouze jednotlivé proteiny.

### ***Vysokoúčinná kapalinová chromatografie***

Neboli high-performance liquid chromatography (HPLC). Proteinové frakce se oddělují za pomoci aniontové výměnné HPLC vyvinuté v roce 1987 Trousdalem

a Bultonem. Při předúpravě vzorku je nutné mikrofiltrací oddělit rušivé látky a koncentrovat protein, s cílem zvýšit detekční signál. Pro tento účel se dá použít například koncentrátor Microsep od firmy Filtron tech, MA, USA. 4 ml každého vzorku se umístí do odstředivky, která odstředí hybnou silou pro ultrafiltraci. Ta je provedena ve dvou krocích:

1) ultrafiltrace přes 300 KD membrány za účelem eliminace vyšších molekulových hmotností (koloidní hmoty)

2) ultrafiltrace filtrátu, který vznikl při prvním kroku 10 KD membránou

Odstředivka s možností řízení teploty se nastaví na 6000 otáček za minutu (3,89 g) a na teplotu 18 °C po nejkratší dobu 3 hodin v závislosti na víně. Sarmiento et. al. (2000) také uvádí, že takto získaný retentát potřeboval třístupňovou diafiltrací odstranit další rušící látky, popřípadě fenolické sloučeniny.

Retentát se resuspenduje v deionizované vodě před diafiltrací. Peak v oblasti 310 - 330 nm klesnul po každém proplachu. Tři proplachy byly dostačující k odstranění ruchu. Objem injekce je 10  $\mu$ l s konstantní rychlostí 1,0 ml.min<sup>-1</sup>. Detekce se provádí při 280 nm. Kolona musí obsahovat iontový výměník například Biorad Biogel SEC DEAE-5PW (Biorad Laboratories, Richmond, USA) s velikostí částic 5  $\mu$ l a rozměry 75 x 7.5 mm<sup>2</sup>. Tato kolona se používá s Tris bufferem (trisaminomethan), který změní pH na 8,0 (roztok A). Eluát se získává s gradientem 0,5 M NaCl při pH 8,0 Tris bufferem (roztok B). Mobilní fáze je filtrována přes 0,22  $\mu$ m membránový filtr a vakuově odplyněná po dobu 1 hodiny před použitím. Postupně vzniká profil koncentrace solí změnou poměrů roztoky A a B (SARMENTO et al., 2000).



**Obr. 11 HPLC Rigol L-3000**

**Zdroj: <http://www.thasar.com/cms/images/rigol/hplc.jpg>**

## ***Rychlá proteinová kapalinová chromatografie***

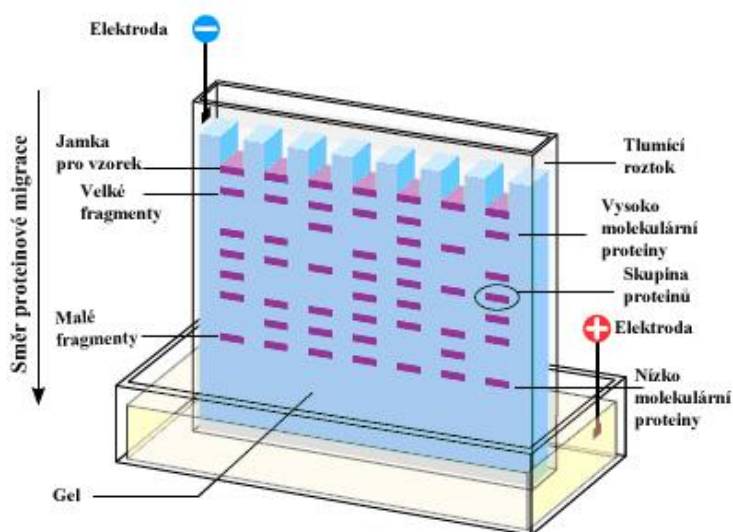
Neboli Fast protein liquid chromatography (FPLC). Každý vzorek 200 ml musí být centrifugován při 4000 g a 4 °C po dobu 5 minut. Podíl 45 ml základního supernatantu se okamžitě dialyzuje po dobu 72 hodin ve třech dialyzačních zkumavkách (SIGMA, dialyzační trubice s celulóзовou membránou, D-9652, Madrid, Španělsko) za účelem odstranění solí a jiných sloučenin s nízkou molekulovou hmotností. Dialyzované vzorky se lyofilizují a uchovávají při teplotě -20 °C. Lyofilizované vzorky se resuspendují v čerstvě získané čisté deionizované vodě (15.60 W.cm<sup>-1</sup>), až do vzniklé koncentrace proteinu asi 0,5 mg.ml<sup>-1</sup> vyjádřeno v BSA (Hovězí sérový albumin). Vzorky se odstředí při 12000 g při teplotě 4 °C po dobu 2 minut a znovu se zamrazí. V den analýzy proběhne opětovná resuspendace lyofilizovaných vzorků v 0,6 ml 0,3 M roztoku octanu amonného (pH 6,80) aby se získala proteinová koncentrace 0,25 µg.µl<sup>-1</sup>. Vzorky byly centrifugovány při 12000 g, 4 °C po dobu 5 min. a supernatant se použije přímo pro FPLC analýzu. Analýza se provede na přístroji Superdex 75 PC 3.2/30 sloupec na FPLC systému (inteligentní systém, Pharmacia, Uppsala, Švédsko). Vzorky 50 ml se injektují a eluují s 0,3 M roztokem octanu amonného při pH 6,80. Průtoková rychlost se pohybuje 40 µl.min<sup>-1</sup>. Eluenty se v koloně kontinuálně sledují při vlnové délce 280 nm za použití µPeak Monitoru (Pharmacia, Uppsala, Švédsko), (LIRA et al., 2015).

### ***2.3.7 Vybrané elektroforetické metody***

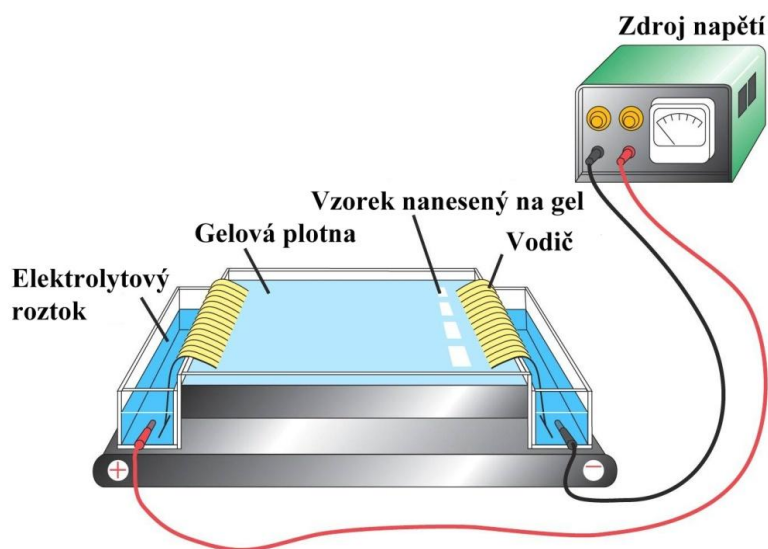
#### ***Elektroforéza na škrobovém gelu***

Nebo také SGE (Starch Gel Electrophoresis) separuje proteiny na základě jejich velikosti i náboje. Nejprve se připraví 14% škrobový gel, který vznikne vařením částečně hydrolyzovaného škrobu s pufrem. Tento gel se nalije do připravené formy a nechá se ztuhnout. Elektroforéza probíhá v blocích s předem definovanými rozměry ve vertikálním nebo horizontálním uspořádání. U vertikální elektroforézy se používá speciální hřeben, který po ztuhnutí gelu vytvoří jamky potřebné pro aplikaci vzorku. U horizontální elektroforézy se gel nalije pouze do připravené formy, kde se nechá ztuhnout. Zde se vzorky nanášejí v podobě silného filtračního papíru nasáklého vzorkem do jamek vytvořených po ztuhnutí speciálním hřebenem. Vertikální elektroforéza vyžaduje zpravidla více škrobu. Nevýhodou horizontální elektroforézy je časová

elektrodekantace, při které se vysokomolekulární proteiny časem propadají na spodní část gelu. Horizontální elektroforéza je mnohem rozšířenější (ZIMA, 2004).



Obr. 12 Vertikální polyakrylamidová gelová elektroforéza. Obrázek byl pozměněn. Zdroj: [http://www.bio-rad.com/webroot/web/images/lsr/solutions/technologies/protein\\_electrophoresis\\_blotting\\_and\\_imaging/protein\\_electrophoresis/technology\\_detail/pet11\\_img1.jpg](http://www.bio-rad.com/webroot/web/images/lsr/solutions/technologies/protein_electrophoresis_blotting_and_imaging/protein_electrophoresis/technology_detail/pet11_img1.jpg)



Obr. 13 Horizontální elektroforéza (CARR, 2005). Obrázek byl pozměněn.

### *Izoelektrická fokusace*

Známa také jako IEF. Jedná se o elektroforetickou metodu, při které dochází k využívání polyakrylamidových gelů s velkými póry, obsahující směs syntetických alifatických polyamino-polykarboxilových skupin zvaných nosné amfolyty. Nosné

amfolyty při této metodě pokrývají široký rozsah izoelektrických bodů. Při připojení elektroforézy ke zdroji elektrického napětí dojde ke tvorbě stabilního lineárního gradientu pH amfolyty. Stabilita je zajištěna anodou a katodou. Po nanesení vzorku na gel se proteiny pohybují pH gradientem do místa, kde dochází k izoelektrické neutralitě proteinu. Výsledkem je velmi přesná rozlišovací schopnost proteinů, a to na 0,01 jednotky proteinových izoelektrických bodů (ZIMA, 2004).

### **2.3.8 Imunologické testy**

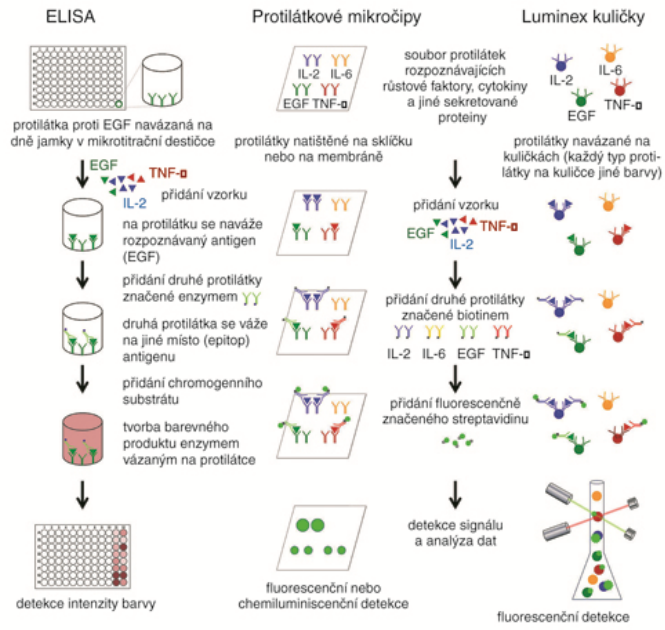
Tyto testy se používají především v lékařství. Slouží k přesnému stanovení jednotlivých proteinů. Jsou náročné na laboratorní vybavení a také po finanční stránce. Při osobní komunikaci s Martinem Viallattem mi bylo sděleno, že se svým týmem vyvinuli nový typ detekce metodou protein blotting, detekce dvou proteinů odpovědných za bílkovinné zákaly ve víně a to chitinázy a thaumatinu podobným proteinům. Detekce funguje formou indikačního papírku, na kterém jsou políčka ošetřená protein blottingem. První políčko znázorňuje stabilní víno a následující políčka na tomto testu znázorňují přímo množství bentonitu potřebného k vyčiření testovaného vína 0, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 g.h<sup>-1</sup>. Při kontaktu zkoumaného vzorku vína s indikačním papírkem, dané množství políček zreaguje a zobrazí tak potřebnou dávku bentonitu. Bližší informace mi bohužel nebyly poskytnuty. Informace byly zjištěny v březnu 2016. Tato metoda by prý měla být v co nejbližší době uvedena na trh pro použití ve vinařství. (VIALATTE, 2016)

### ***Protein blotting***

Jedná se o imunologickou metodu, která je velmi náročná na finance. Tato metoda začíná elektroforetickou separací proteinů na gelu, následně dojde k elektroforetickému přenosu přes membránu, na které je nanesená protilátka. Protilátka naváže daný protein a dojde k imunologické například fluorescenční detekci a vyhodnocení výsledků. Tato metoda je schopná měřit pouze určité předem definované proteiny, nikoliv celkové množství všech termolabilních proteinů (Protein Blotting Guide, 2015).



### Princip imunologických metod



Obr. 14 Princip imunologických metod (SKALNÍKOVÁ, 2013).

### **3 Cíl práce**

Cílem této práce bylo prostudovat literaturu týkající se termolabilních bílkovin, jejich vlivu na koloidní stabilitu vína a metod jejich stanovení. V praktické části bylo cílem v nestabilizovaných vínech stanovit různými metodami obsah bílkovin a získané výsledky vyhodnotit z hlediska vhodnosti jednotlivých metod pro vinařskou praxi.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Materiál

Pro pokusné metody byla použita nevyčiřená vína vyrobená ve Vinařství Hodeček a Vinařství Holánek.

#### *Veltlínské zelené*

Odrůda původem pravděpodobně z Rakouska, jako zkratka pro tuto odrůdu se používá VZ. Jedná se o pozdní moštovou odrůdu, která dosahuje vysokého výnosu 10 – 15 t.ha<sup>-1</sup>. Je nejvíce pěstovanou odrůdou na Znojemsku a patří mezi uznané odrůdy pro VOC Znojmo. Tato odrůda poskytuje harmonická vína s jemnou vůní po lipovém květu, bílém pepři či broskvi, v chuti je slabě hořkomandlové a má velice příjemné kyseliny. Do Státní odrůdové knihy byla zapsána v roce 1941 (SEDLO a LUDVÍKOVÁ, 2014). Po technologické stránce je známa svým vysokým obsahem termolabilních bílkovin, a proto byla vybrána pro tento pokus.



Veltlínské zelené - [www.znalecvin.cz](http://www.znalecvin.cz)

Obr. 15 „Veltlínské zelené“. Zdroj: <http://www.znalecvin.cz/veltinske-zelene/>

#### *Cabernet Sauvignon*

Odrůda původem z Francie, jako zkratka pro tuto odrůdu se používá CS. Pravděpodobně se jedná o křížence „Cabernet Franc“ x „Sauvignon“. Její existence spadá asi již do doby římské a v polovině 16. století se ve Francii v oblasti Bordeaux o její rozšíření zasloužil kardinál Richelieu. Tato odrůda se pěstuje celosvětově.

Koncem 20. století se stala nejmódnější modrou odrůdou. Rok zápisu do Státní odrůdové knihy v České republice je 1980. Pěstuje se na nejteplejších oblastech a poskytuje výnos 6 – 9 t.ha<sup>-1</sup>. Aromatiku má po černém rybízu, cedrovém dřevě, mátě pepné, ostružinách až marmeládě. Nejpěstovanější je v Mikulovské vinařské podoblasti (SEDLO a LUDVÍKOVÁ, 2014). Pro tento pokus bylo použito rosé víno vyrobené z této odrůdy a tato odrůda byla vybrána zcela náhodně.



**Obr. 16 „Cabernet Sauvignon“. Zdroj: <http://www.znalecvin.cz/cabernet-sauvignon/>**

Hrozny z Vinařství Hodeček pocházely z České vinařské oblasti Morava, Znojemské vinařské podoblasti a především obce Miroslavské Knínice, ve které byly sklizeny z vlastní vinice, která se nachází na viniční trati Stará hora. Nadmořská výška je zde přibližně 300 metrů nad mořem, s průměrnou roční teplotou 8,6 °C a pH půdy 7,1. Podloží je tvořeno žulou českého masivu, půda je jílovito-písčítá se slabě štěrkovitou strukturou a 25% skeletovostí.

Hrozny z Vinařství Holánek pocházely z Moravské vinařské oblasti, Mikulovské podoblasti a obce Iváň. Byly sklizeny z vlastních vinic Vinařství Holánek, které se nacházejí na viniční trati Aeibis.

Sklizené hrozny byly ve výborném pěstitelském stavu bez viditelných známek poškození houbovými patogeny.

K pokusu byly použity především odrůdy révy vinné bohaté na termolabilní bílkoviny, a to „Veltlínské zelené“ z Vinařství Hodeček vyrobené reduktivní cestou a „Veltlínské zelené“ z Vinařství Holánek vyrobené metodou sur-lie bez přídavku síry.

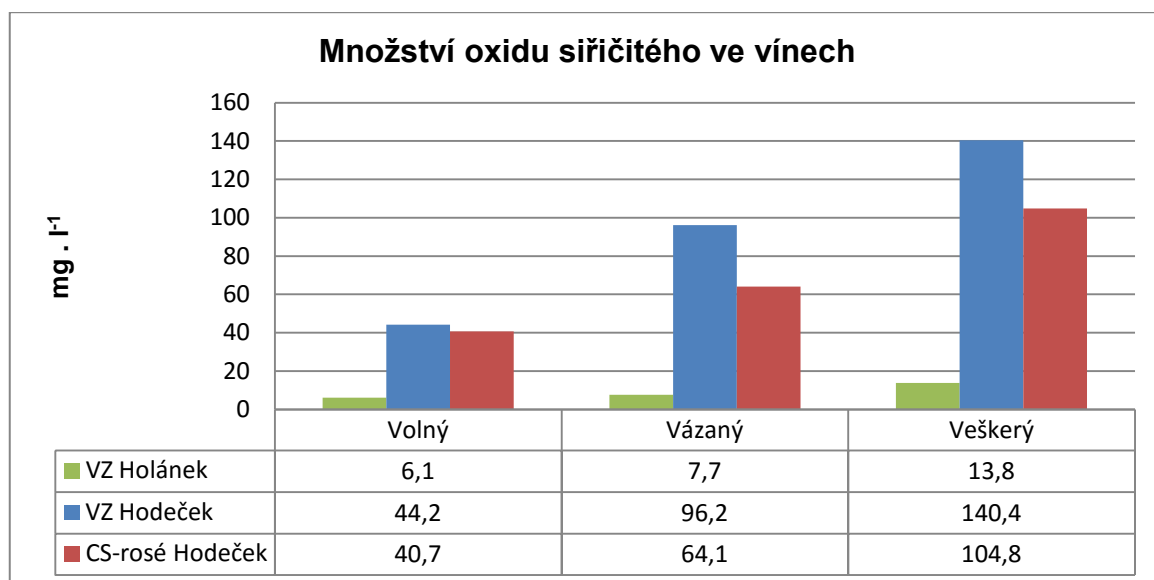
Dále se použila modrá odrůda „Cabernet Sauvignon“, ze které bylo vyrobeno rosé víno.

Výroba vín z Vinařství Hodeček probíhala reduktivní metodou. Hrozny byly ihned po sklizni pomlety a odstopkovány s následným sířením na rmut, dávkou síry  $10 \text{ mg.l}^{-1}$ . Následně probíhala macerace 6 – 12 hodin u bílých vín a 24 hodin u rosé vín, po které probíhalo lisování hroznů. Po lisování se mošty gravitačně odkalovaly, bez použití čířících látek, po dobu 6 – 12 hodin. Po odkalení se jednotlivé mošty zakvasily ušlechtilými odrůdovými kulturami kvasinek, které prokvasily mošty na vína požadovaného stylu. Po prokvašení byla vína sířena přibližně na  $80 \text{ mg.l}^{-1}$  a postupně dosiřována z důvodu udržení hladiny volné síry okolo  $40 \text{ mg.l}^{-1}$ . Následně proběhla dvě stáčení z kalů. Víno bylo vyfiltrováno na deskovém filtru značky FILTREX o rozměrech 20 x 20 se čtyřmi komorami. Filtračními deskami s označením T 20 pro předfiltraci a ST 5. ST 5 jsou filtrační celulóзовé desky pro sterilní filtraci s porézností  $0,3 \text{ }\mu\text{m}$ . Tímto se zkoumané vzorky vín vyčistily od pevných anorganických i organických částic do průměru  $0,3 \text{ }\mu\text{m}$ , které by mohly vést k tvorbě nepřesných údajů. Před měřením se provedl analytický rozbor vín, který je viditelný v Tab. 1 a Grafu 4. V Tab. 1 je vidět obsah skutečného alkoholu, titrovatelných kyselin, redukujících cukrů, pH, kyseliny jablečné, kyseliny mléčné, kyseliny octové, kyseliny vinné, glycerolu a hustota všech zkoumaných vín. V Grafu 4 je možné vidět obsah oxidu siřičitého ve víně ve formě volného oxidu siřičitého, vázaného oxidu siřičitého a veškerého oxidu siřičitého. Stanovení oxidu siřičitého probíhalo jodometricky.

**Tab. 1 Analytický rozbor FTIR analyzátozem Alpha od firmy BRUKNER.**

Alfa	Alkohol %	Titř kys. g.l <sup>-1</sup>	Red.cukry g.l <sup>-1</sup>	pH	Jablečná g.l <sup>-1</sup>
VZ Holánek	12,6	6,35	0,8	3,21	0,18
VZ Hodeček	12,42	7,07	1,7	3,16	2,49
CS-rosé Hodeček	12,65	8,48	3,8	3,07	3,24
Alfa	Mléčná g.l <sup>-1</sup>	Octová g.l <sup>-1</sup>	Vinná g.l <sup>-1</sup>	Glycerol g.l <sup>-1</sup>	Hustota
VZ Holánek	1,43	0,21	2,63	7,16	0,99052
VZ Hodeček	0,32	0,15	2,21	7,49	0,99219
CS-rosé Hodeček	0,18	0,26	2,37	9,18	0,99425

V Tab. 1 můžeme vidět, že nejvyšší obsah skutečného alkoholu má rosé víno a zároveň má také nejvyšší obsah titrovatelných kyselin, redukujících cukr, kyseliny jablečné, kyseliny octové, glycerolu a také nejvyšší hustotu. „Veltlínské zelené“ z Vinařství Holánek ukazuje ve svých hodnotách, že proběhlo biologické odbourání kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou, které má nejvyšší obsah ze všech vín, zároveň má toto víno také poměrně vysoký obsah kyseliny octové.



**Graf 4 Jodometrické stanovení oxidu siřičitého ve vínech.**

V Grafu 4 můžeme pozorovat jodometrické stanovení oxidu siřičitého ve víně. Nejvyšší hodnotu volného oxidu siřičitého i veškerého oxidu siřičitého mělo „Veltlínské zelené“ z Vinařství Hodeček. Nejnížší hodnotu oxidu siřičitého mělo „Veltlínské zelené“ z Vinařství Holánek. Tento oxid siřičitý pocházel z kvasného procesu.

Nejprve jsme provedli zjištění obsahu reduktonů ve víně a následně jsme provedli titrační stanovení oxidu siřičitého. Pokud víno obsahuje reduktony tak se odečtou od natitrovaných hodnot u volného oxidu siřičitého i od natitrovaných hodnot u veškerého oxidu siřičitého.

a) Volný oxid siřičitý

Stanovení volného oxidu siřičitého probíhalo napipetováním 50 ml vína do 250 ml baňky, následně se přidalo 10 ml 16% kyseliny sírové a 5 ml 0,5% škrobového mazu s následnou titrací 0,02 mol.l<sup>-1</sup> roztokem jódu do modrého zbarvení, které vydrží nejméně 30 sekund ( $a_1$  = spotřeba).

b) Veškerý oxid siřičitý

Stanovení veškerého oxidu siřičitého probíhalo napipetováním do 250 ml baňky 25 ml 1 mol.l<sup>-1</sup> hydroxidu sodného a 50 ml vína, následně probíhala 15 minutová reakce vína po reakci se přidá 15 ml kyseliny sírové a 5 ml 0,5% škrobového mazu s následnou titrací 0,02 mol.l<sup>-1</sup> roztokem jódu do modrého zbarvení, což vydrží déle jak 30 sekund ( $a_2$  = spotřeba).

c) Vázaný oxid siřičitý

Vázaný oxid siřičitý se zjistí jednoduchou metodou a to odečtením volného oxidu siřičitého od veškerého oxidu siřičitého.

$$x = a_2 - a_1$$

Výpočet obsahu oxidu siřičitého probíhal pomocí vzorce:

$$x_{1,2} = a_{1,2} \times f \times 12,8$$

f = faktor roztoků jódu 1,0102

$x_1$  = mg.l<sup>-1</sup> volného oxidu siřičitého v celých číslech

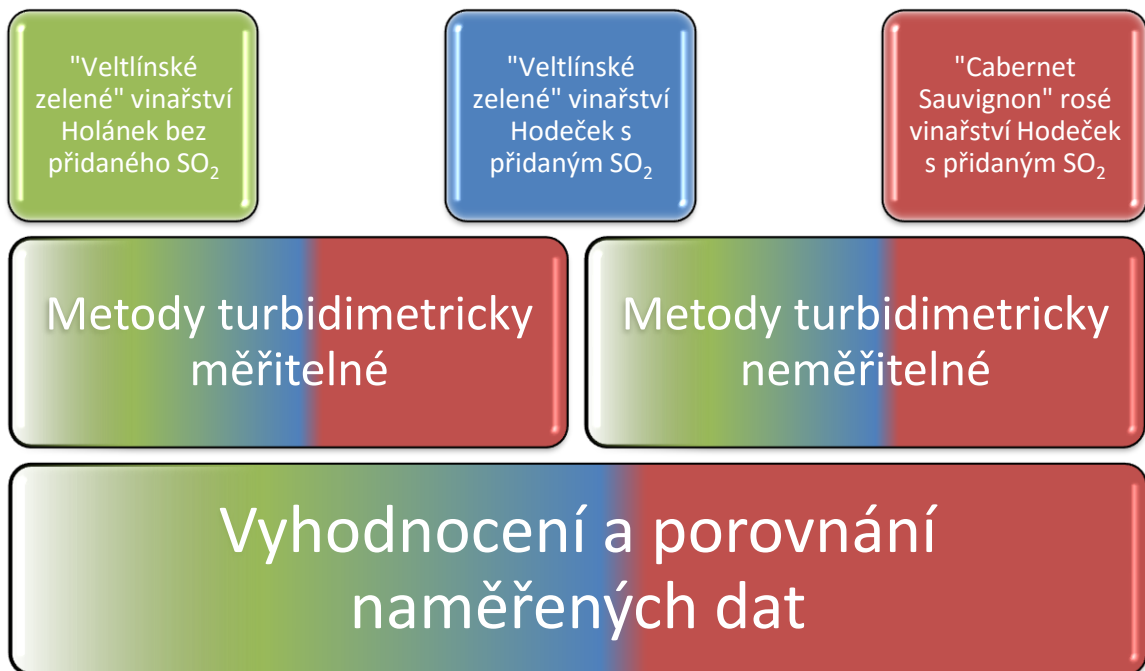
$x_2$  = mg.l<sup>-1</sup> veškerého oxidu siřičitého v celých číslech

$x_3$  = mg.l<sup>-1</sup> vázaného oxidu siřičitého v celých číslech

$a_{1,2}$  = spotřeba 0,02 mol.l<sup>-1</sup> roztoku jódu na volný či veškerý oxid siřičitý

## 4.2 Metody

### Schéma pokusu



Obr. 17 Schéma pokusu.

K pokusu byla vybrána odrůda „Veltlínské zelené“, která je známá svým vysokým obsahem termolabilních bílkovin a odrůda „Cabernet Sauvignon“ ve variantě rosé, aby bylo možné porovnat stanovení nejen na bílých vínech, ale i na rosé vínech a byla tak projevna vyšší variabilita při pokusu. „Veltlínské zelené“ bylo ve dvou variantách, a to jako víno vyráběné oxidativní metodou a reduktivní metodou. U „Cabernet Sauvignonu“ se jednalo pouze o reduktivní typ rosé vína.

Varianta s oxidem siřičitým a bez oxidu siřičitého byla vybrána díky článku od Chagas et al. (2016), který se věnuje vlivu oxidu siřičitého na termolabilitu bílkovin ve vínech.

Jako první byly u vín změřeny jejich základní analytické vlastnosti. Po zjištění základních analytických vlastností jednotlivých vín mohlo začít stanovování obsahu termolabilních bílkovin jednotlivými vybranými metodami. K vyhodnocení většiny výsledků se užíval turbidimetr, a proto se jednotlivé metody rozdělily na dvě skupiny metod, a to metody turbidimetricky měřitelné a turbidimetricky neměřitelné. Pro zpřesnění výsledků se provedly jednotlivé pokusy i na vyčiřených vínech ve třech opakováních s následným zprůměrováním výsledných hodnot.



Na vyčiření odrůdy „Veltlínské zelené“ z Vinařství Hodeček bylo zapotřebí celkově  $250 \text{ g.hl}^{-1}$  bentonitu a k vyčiření „Cabernet Sauvignonu“ rosé bylo zapotřebí pouze dávky  $100 \text{ g.hl}^{-1}$ . Pro turbidimetrické měření bylo zapotřebí 20 ml vzorku do kyvety,

a proto se jednotlivé metody upravily tak, aby vzniklo požadované množství vzorku k testování. Veškeré měření probíhalo v laboratoři Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně, s místem působení v Lednici na Ústavu vinohradnictví a vinařství.

### ***Turbidimetrické měření***

Nejprve se změřila turbidita vín a následně se provedly pokusy. Počáteční hodnota turbidity se odečetla od naměřené turbidity u výsledků pokusů, tím vzniklo stanovení turbidity jednotlivými metodami.

Měření se započalo kalibrací turbidimetru. Kalibrace probíhala vkládáním kalibračních vzorků do turbidimetru o hodnotách 1000 NTU 10 NTU 0,02 NTU. Po spuštění turbidimetru se zmáčklo kalibrační tlačítko CAL následně turbidimetr požádal o vložení kalibrační kyvety s 1000 NTU. Před vložení kalibračního standardu se nejprve kalibrační kyveta důkladně očistila a následně se vložila do přístroje. Po vložení kyvety se zmáčklo tlačítko ENTER nebo jak vidíme na Obr. 18 velké tlačítko se šipkou ukazující doleva. Po zkalibrování požádal přístroj o další kyvetu o turbiditě 10 NTU, vše se opakovalo až do úplného nakalibrování po vložení kyvety s turbiditou 0,02 NTU. Následně mohlo začít měření nejprve čistého vína a následně probíhala měření všech pokusných metod pro stanovení termolabilních bílkovin. Každý pokus byl proveden ve třech opakováních a všechna měření se následně zprůměrovala.

Pocock se svým týmem uvádí, že pokud má vyčiřený a vyfiltrovaný testovaný vzorek vína vyšší turbiditu než 2 NTU lze považovat daný vzorek za nestabilní na termolabilní bílkoviny (POCOCK et al., 2006).



**Obr. 18 Turbidimetr Wissenschaftlich-Technische 550IR. Zdroj:**  
<http://www.thermofisher.cz/produkty/turbidimetr-turb-550ir>

### ***I. Metody turbidimetricky měřitelné***

U rychlého i pomalého ohřevu došlo nejdříve k předeřtání termostatické lázně na požadovanou teplotu, aby došlo k cílenému výsledku. Všechny metody převzaty z literární části.

#### ***Rychlé zahřívání***

##### **Pomůcky**

pečicí trouba nebo vodní lázeň, lednička, hliníková laboratorní fólie, erlenmeyerova baňka 150 ml, laboratorní teploměr, vzorek sterilně vyfiltrovaného vína, 20 ml kalibrovaná pipeta

##### **Metodika**

Napipetujeme 20 ml testovaného vzorku do erlenmeyerovy baňky, přikryjeme hliníkovou laboratorní fólií, aby nedocházelo k odparu, a zahřejeme ve vodní lázni, nebo v troubě na 90 °C po dobu 1 hodiny. V případě použití trouby nejdříve předeřtíme troubu na požadovanou teplotu. Následně zkoumaný vzorek zchladíme v ledničce na 4 °C po dobu 6 hodin. Před turbidimetrickým měřením vzorek promícháme. Vzniklý zákal měříme turbidimetricky, jako standard použijeme sterilně vyfiltrovaný vzorek daného vína, který změříme před testem jako první. Vždy provedeme u každého vzorku tři opakování jednotlivých měření, aby byl pokus průkazný.

### ***Pomalé zahřívání***

#### Pomůcky

pečicí trouba nebo vodní lázeň, lednička, hliníková laboratorní fólie, erlenmeyerova baňka 150 ml, laboratorní teploměr, vzorek sterilně vyfiltrovaného vína, 20 ml kalibrovaná pipeta

#### Metodika

Napipetujeme 20 ml testovaného vzorku do erlenmeyerovy baňky, přikryjeme hliníkovou laboratorní fólií, aby nedocházelo k odparu, a zahřejeme ve vodní lázni nebo v troubě na 60 °C po dobu 4 hodin. V případě použití trouby nejdříve předehřejeme troubu na požadovanou teplotu. Následně zkoumaný vzorek zchladíme v ledničce na 4 °C po dobu 6 hodin. Vzniklý zákal měříme turbidimetricky a před měřením vždy jednotlivý vzorek promícháme. Jako standard použijeme sterilně vyfiltrovaný vzorek daného vína. Vždy provedeme u každého vzorku tři opakování, aby byl pokus průkazný.

### ***Test kyselinou sulfosalicylovou***

#### Pomůcky

erlenmeyerova baňka 150 ml, 20 ml kalibrovaná pipeta, 5 ml kalibrovaná dělená pipeta, 10% kyselina sulfosalicylová (2-hydroxy-5-sulfobenzoová kyselina), hliníková laboratorní fólie, vzorek sterilně vyfiltrovaného vína

#### Metodika

20 ml testovaného vína napipetujeme do erlenmeyerovy baňky, přidáme pipetou 2 ml 10% kyseliny sulfosalicylové. Vzorek přikryjeme hliníkovou laboratorní fólií a po reakční době cca 15 – 20 minut zkontrolujeme obsah zkumavky. Vzorek promícháme a změříme obsah turbidity. Pokus provedeme ve třech opakováních, které následně zprůměrujeme. Pro přesnější výsledky změříme obsah turbidity také u slepého vzorku.

### ***Test kyselinou trichloroctovou***

#### **Pomůcky**

erlenmeyerova baňka 150 ml, 20 ml kalibrovaná pipeta, 5 ml kalibrovaná dělená pipeta, 55% kyselina trichloroctová (kyselina trichlorethanová), hliníková laboratorní fólie, vodní lázeň, laboratorní teploměr, vzorek sterilně vyfiltrovaného vína

#### **Metodika**

20 ml testovaného vzorku napipetujeme do erlenmeyerovy baňky. Přidáme 2 ml 55% kyseliny trichloroctové. Vzorek přikryjeme hliníkovou laboratorní fólií a vložíme do přehřáté vodní lázně, na 2 minuty přivedeme k varu a následně necháme reagovat při pokojové teplotě 20 °C po dobu 15 – 20 minut. Po reakční době vzorek důkladně promícháme a provedeme turbidimetrické měření. Pro přesnější výsledky provedeme test ve třech opakováních. Výsledky zhodnotíme turbidimetricky proti slepému pokusu.

### ***Taninový test***

#### **Pomůcky**

100 ml odměrná baňka, erlenmeyerova baňka 50 ml, 5 ml kalibrovaná dělená pipeta, etanol, galický tanin, kalibrovaný odměrný válec 50 ml, hliníková laboratorní fólie, vodní lázeň, laboratorní teploměr, kalibrovaná laboratorní váha, vzorek sterilně vyfiltrovaného vína.

#### **Metodika**

Rozpustíme 1 g galického taninu v 10 ml destilované vody při 70 °C ve vodní lázni ve 100 ml odměrné baňce. Když je tanin dobře rozpuštěn, přidáme 50 ml destilované vody a doplníme celý objem do 100 ml etanolem. 3,2 ml roztoku taninu přidáme do 40 ml testovaného vína. Vzorek přikryjeme hliníkovou laboratorní fólií a důkladně promícháme, necháme reagovat při pokojové teplotě 15 minut, poté vložíme do vařící lázně na 3 minuty. Po zchlazení vzorek důkladně promícháme a provedeme měření turbidity. Výsledky zhodnotíme turbidimetricky proti slepému pokusu. Test provádíme ve třech opakováních.

### ***Etanolový test***

#### Pomůcky

25 ml uzavíratelná kalibrovaná zkumavka, 10 ml kalibrovaná dělená pipeta, etanol, vzorek sterilně vyfiltrovaného vína

#### Metodika

Napipetujeme 10 ml čistého etanolu do kalibrované zkumavky a 10 ml sterilně vyfiltrovaného vína, následně zkumavku hermeticky uzavřeme a necháme 2 hodiny reagovat. Při vytvoření zákalu víno obsahuje termolabilní bílkoviny. Následně změříme turbiditu oproti slepému pokusu. Před měřením vzorek důkladně promícháme. Test provedeme ve třech opakováních.

### ***II. Metody turbidimetricky nezměřitelné***

#### ***Pěnová zkouška***

#### Pomůcky

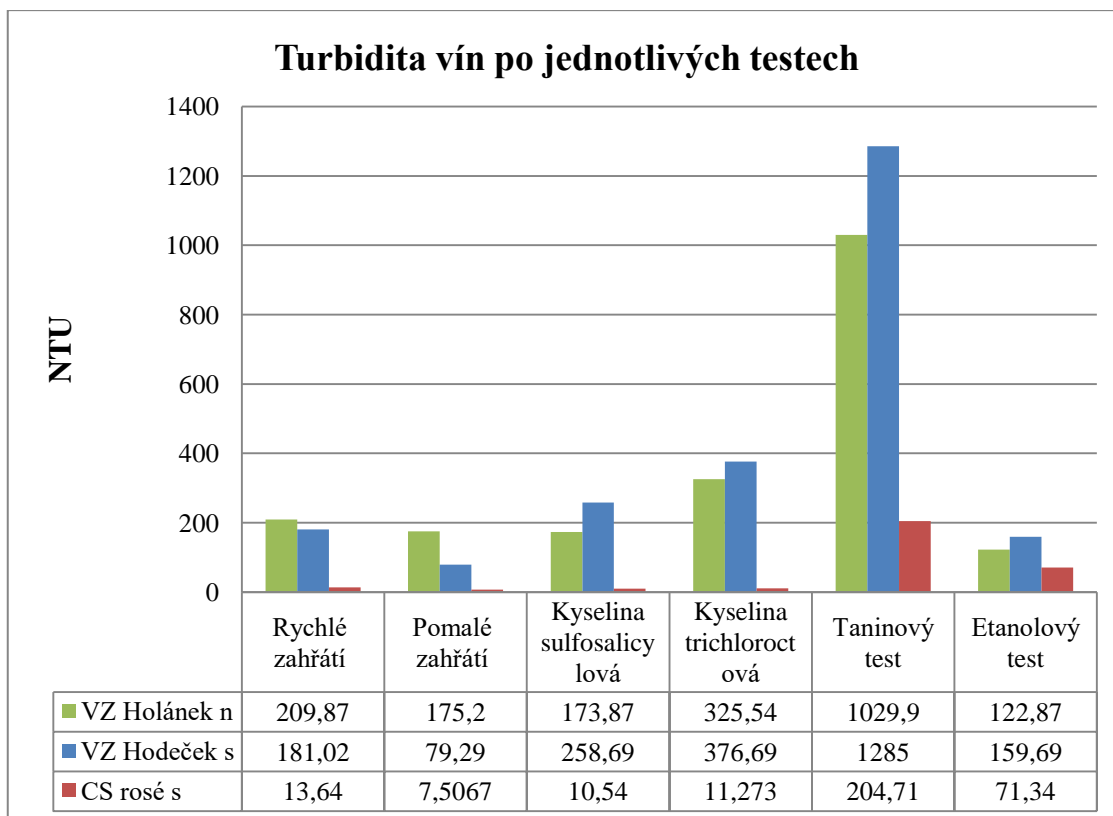
25 ml uzavíratelná kalibrovaná zkumavka, 10 ml kalibrovaná dělená pipeta, vodní lázeň, laboratorní teploměr, vzorek sterilně vyfiltrovaného vína

#### Metodika

Testované vzorky vína napipetujeme do kalibrované zkumavky po 10 ml, zahřejeme na 80 °C a následně zchladíme na laboratorní teplotu. Zchlazené víno protřepeme v případě, že vzniklá pěna ve zkumavce vydrží déle než jednu minutu, hrozí tvorba bílkovinného zákalu (BALÍK, 2006).

### **4.3 Vyhodnocení**

Zprůměrované výsledky pokusů byly v jednotkách NTU, až na pěnovou zkoušku, u které vznikly výsledky v metrických jednotkách (mililitrech).



**Graf 5 Zprůměrované naměřené hodnoty termolabilních bílkovin jednotlivými metodami u nevyčiřených vín pomocí turbidimetru Wissenschaftlich-Technische 550IR.**

V Grafu 5 můžeme vidět naměřené množství termolabilních bílkovin v turbidimetrických jednotkách NTU tedy v množství zákalu vzniklého po jednotlivých testech stability.

Za nejvyššími zákalami v nečiřených vínech stál taninový test. Tento test vytvořil takovou turbiditu, že kdybychom brali tyto výsledky v úvahu jako výsledky, podle kterých by čiření mělo probíhat, tak lze předpokládat, že víno bychom zcela určitě přechřídili. Tyto hodnoty byly několikanásobně vyšší než při všech ostatních testech. Nejvyšší zákal se však udělal u vína vyráběného reduktivní cestou, a to u „Veltlínského zeleného“ od Vinařství Hodeček. Lze předpokládat, že kombinace taninu rozpuštěného v etanolu s následným ohřevem při tomto testu denaturovala nejvyšší množství bílkovin obsažených ve zkoumaných nečiřených vínech a tudíž můžeme konstatovat, že tento test je nejdestruktivnější. Také můžeme říct, že tanin se do vína před lahvováním může dostat pouze vyluhováním z korkové zátky a alkohol se může navýšit pouze refermentací v lahvi pokud nevyrobíme vína fortifikovaná, proto je tento test dosti nepravděpodobný.

Test kyselinou trichloroctovou a dvouminutovým varem vína vytvořil celkem silný zákal oproti ostatním testům a stejně jako test taninový určil za víno s nejvyšším

obsahem termolabilních bílkovin víno vyrobené reduktivní metodou, a to VZ z Vinařství Hodeček. Kombinace kyseliny trichloroctové a varu je dosti silným denaturačním činidlem pro bílkoviny. Vysoluje příliš vysoké množství bílkovin.

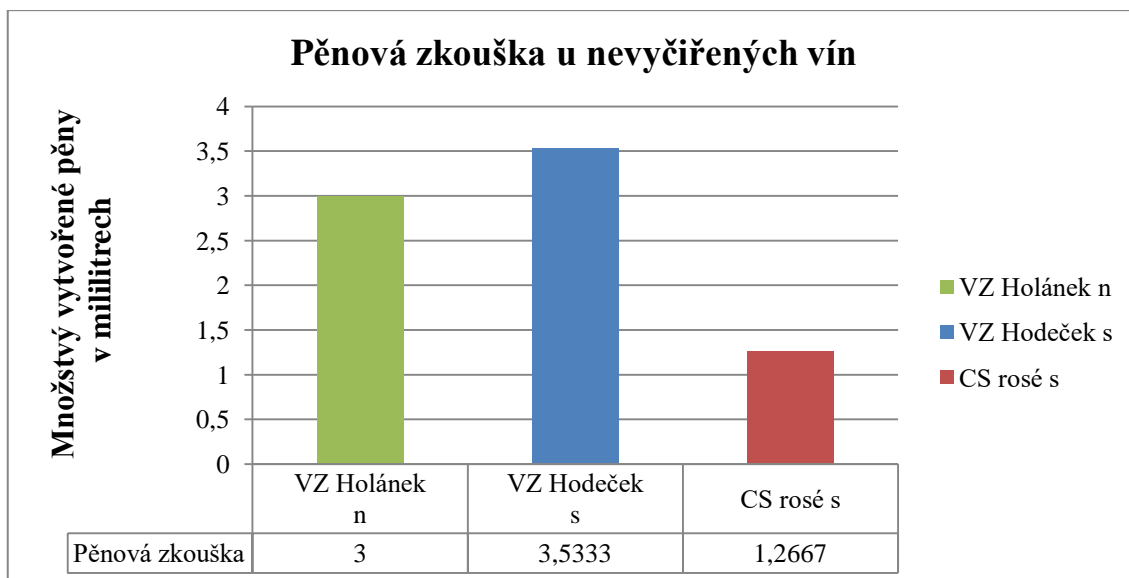
Je zajímavé, že „Cabernet Sauvignon“ rosé obsahoval bez číření pouze malé množství termolabilních bílkovin při všech testovaných metodách stanovení termolabilních bílkovin, až na taninový a etanolový test.

Etanolový test nebyl tolik destruktivní metodou pro stanovení obsahu termolabilních bílkovin, ačkoliv navýšení alkoholu může vzniknout pouze umělým dolihováním či přírodní refermentací vína. Tato metoda stanovila jako víno s nejvyšším obsahem termolabilních bílkovin víno vyráběné reduktivní metodou, a to VZ z Vinařství Hodeček, avšak u této metody byl oproti ostatním metodám vysoký obsah termolabilních bílkovin u „Cabernet Sauvignon“ rosé, kde byly tyto hodnoty velmi nadhodnoceny, podobně jako u taninového testu.

Kyselina sulfosalicylová vykazovala nejlepší hodnoty jako tepelné testy. Hodnoty byly v rozmezí mezi rychlým zahřátím a pomalým zahříváním až na VZ z Vinařství Hodeček, které mělo touto metodou nejvyšší obsah termolabilních bílkovin oproti tepelným testům.

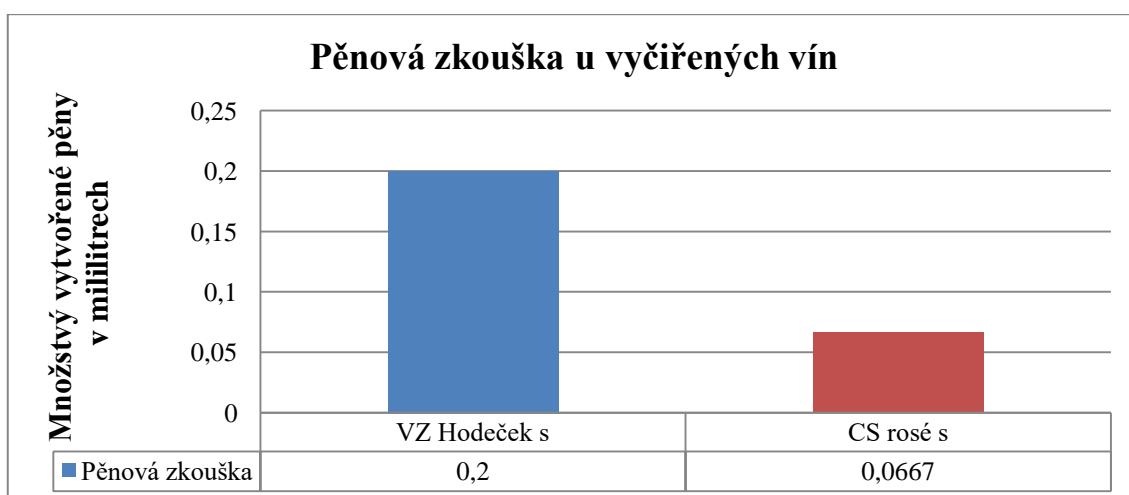
Tepelné testy na rozdíl od všech ostatních testů prokázaly, že nejvyšší obsah termolabilních bílkovin má víno vyrobené reduktivní metodou bez použití oxidu siřičitého, a to „Veltlínské zelené“ z Vinařství Holánek. Tepelné testy bychom mohli považovat za nejpřesnější, protože v hotovém víně může termolabilní bílkovinu denaturovat již pouze skladování v nevhodných podmínkách způsobených teplotními výkyvy, například při převozu či na místě uložení.

Za nejpodobnější metodu tepelným metodám z hlediska množství denaturovaných termolabilních bílkovin a tvorby zákalu se dá považovat test kyselinou sulfosalicylovou.



**Graf 6** Zprůměrované naměřené hodnoty z pěnové zkoušky u nevyčiřených vín.

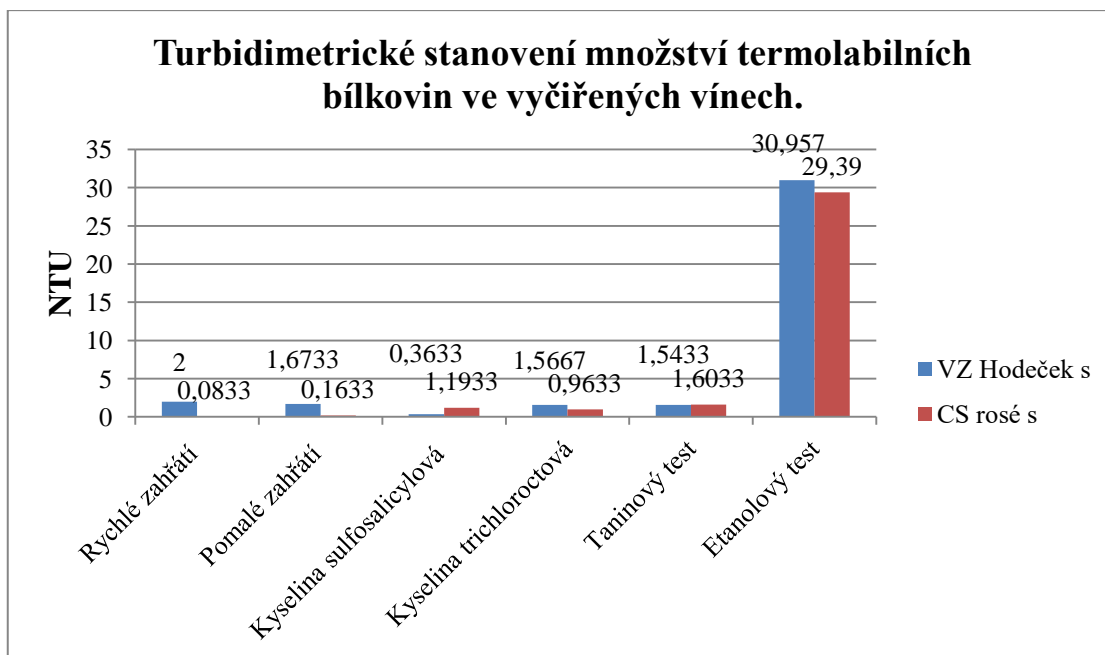
V Grafu 6 můžeme vidět, že při pěnové zkoušce má nejvyšší obsah termolabilních bílkovin „Veltlínské zelené“ z Vinařství Hodeček vyráběné reduktivní metodou. Že víno vyráběné reduktivní metodou s použitím oxidu siřičitého obsahuje vyšší množství termolabilních bílkovin dokazují i ostatní použité metody jako kyselina sulfosalicylová, kyselina trichloroctová a taninový a etanolový test. Pouze tepelné testy dokazují pravý opak. V množství termolabilních bílkovin následuje víno vyráběné reduktivní metodou z Vinařství Holánek, stejně jako u ostatních testů, a nejnižší obsah má rosé víno „Cabernet Sauvignon“.



**Graf 7** Zprůměrované naměřené hodnoty termolabilních bílkovin z pěnové zkoušky u vyčiřených vín.

V Grafu 7 můžeme vidět i obsah pěny po vyčiření u VZ z Vinařství Hodeček s množstvím pěny 0,2 ml a CS rosé z Vinařství Hodeček s množstvím pěny 0,07 ml.



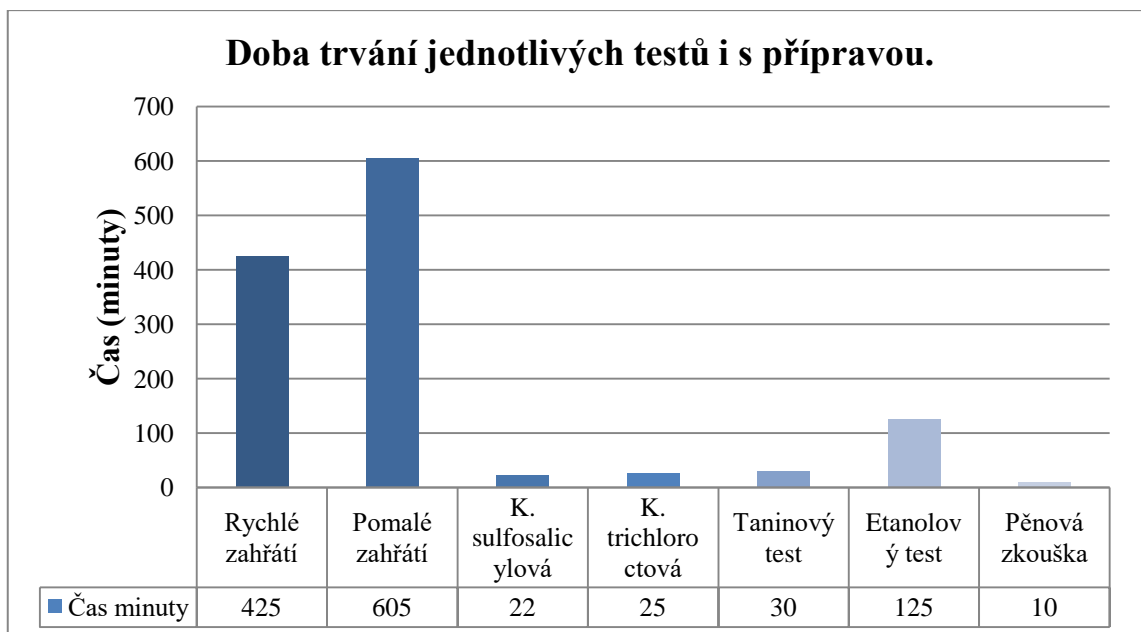


**Graf 8** Zprůměrované naměřené hodnoty termolabilních bílkovin jednotlivými metodami u vyčiřených vín pomocí turbidimetru Wissenschaftlich-Technische 550IR.

Taninový test, který vykazoval při pokusu s nevyčiřenými víny vysoké hodnoty turbidity, se nyní jeví jako ostatní testy. Při měření nyní vyniká etanolový test, který má velmi vysoké hodnoty turbidity, i když se jedná o vína vyčiřená a stabilní na termolabilní bílkoviny. V tomto případě můžeme konstatovat, že při aplikaci etanolu do vína došlo k reakci etanolu se sacharidy či ionty vápníku a následné tvorbě zákalu, proto se dá tento test považovat za nepřesný.

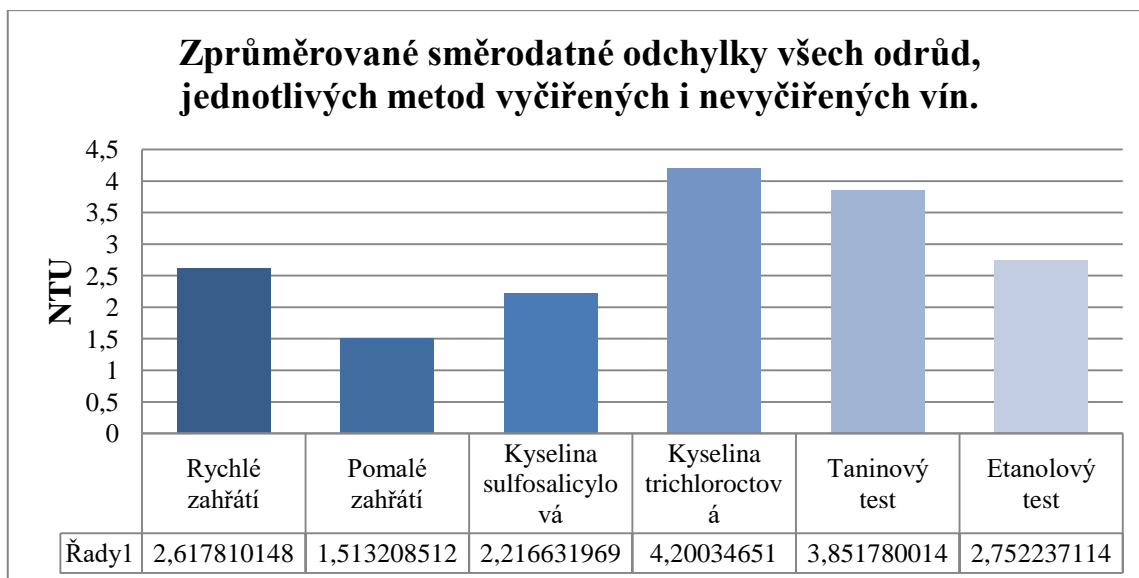
Nejnižší hodnoty turbidity nám ukázal test kyselinou sulfosalicylovou, a to 0,36 NTU pro „Veltlínské zelené“ a 1,19 NTU pro „Cabernet Sauvignon“ rosé.

Další nejnižší hodnoty byly vyprodukovány pěnovou zkouškou, která je měřena místo v nefelometrických turbidimetrických jednotkách v objemových jednotkách, a to 0,2 ml pěny pro „Veltlínské zelené“ a 0,07 ml pěny pro „Cabernet Sauvignon“ rosé, která v obou případech do 5 minut opadla. Jelikož se v odborné literatuře uvádí, že pěna by neměla přetrvávat po dobu delší než 1 minuta, považuji tuto zkoušku za nepřesnou.



**Graf 9** Časové znázornění délky jednotlivých testů i s přípravou pomocných roztoků.

Jako nejdelší test lze považovat tepelný test formou pomalého ohřevu. Tento test trval celkovou dobu 10 hodin a 5 minut, než bylo možné výsledky zhodnotit. Následovalo rychlé zahřátí, které trvalo 7 hodin a 5 minut. Etanolový test byl na třetím místě s délkou trvání 2 hodiny a 5 minut. Dalším testem byl taninový půlhodinový test a test kyselinou trichloroctovou. Jako nejrychlejší se jevila pěnová zkouška a test kyselinou sulfosalicylovou, který vypadal při jednotlivých měřeních turbidity jako neefektivnější způsob stanovení optimálního množství termolabilních bílkovin, oproti tepelným testům, které jsou příliš zdlouhavé, ale na druhou stranu velice přesné, protože pokud se neprojeví denaturace bílkoviny při tepelném působení, tak by již v budoucnu neměla denarovat ani v lahvi.



**Graf 10 Zprůměrované směrodatné odchytky jednotlivých metod u vyčiřených i nevyčiřených vín.**

V Grafu 10 můžeme vidět zprůměrované směrodatné odchytky z jednotlivých měření všech vín od daného typu testu, a to u vyčiřených i nevyčiřených vín. Směrodatné odchytky nám ukazují chybu měření, tudíž můžeme prohlásit, že s nejnižší chybou měření měřila metoda pomalého ohřevu na 60 °C po dobu 4 hodin a 6 hodin v ledničce. Druhé místo zaujala metoda s 10% kyselinou sulfosalicylovou a třetí místo v přesnosti získala metoda rychlého zahřátí, a to na 90 °C po dobu 1 hodiny a 6 hodin v ledničce.

Zprůměrovaná směrodatná odchytky u pěnové zkoušky vyšla 0,250589014. V porovnání s ostatními testy měla nejnižší odchytku a tím lze předpokládat, že i nejmenší chybu, ale tuto odchytku nelze porovnávat s ostatními, protože tato zkouška byla měřena v jiných jednotkách než všechny ostatní metody. Z tohoto důvodu musíme tuto metodu porovnat samostatně. Metoda byla jednoduchá na provedení, ale pěna působila klamavým dojmem a nemohu prohlásit, že by tato metoda byla stejně přesná jako testy tepelné, či kyselina sulfosalicylová. Tuto metodu bych navrhol použít pouze jako orientační metodu nikoliv jako metodu, která určí přesné množství termolabilních bílkovin.

#### **4.4 Diskuze**

Obsah termolabilních bílkovin byl měřen různými metodami. Měření bylo provedeno na Ústavu vinohradnictví a vinařství Zahradnické fakulty v Lednici na Moravě.

Pomalé i rychlé zahřátí dokázalo, že čím více se víno zahřeje, tím více denaturuje termolabilních bílkovin i s ohledem na trvání testu. Esteruelas se svým týmem hodnotí tepelné testy jako nejvhodnější metodu ke stanovení termolability vín z hlediska chemického složení vzniklého zákalu (ESTERUELAS et al., 2009).

Pomalý ohřev probíhal zahřátím vína na 60 °C po dobu 4 hodin a následného zchlazení na 6 hodin v chladícím zařízení. Testované víno denaturovalo méně termolabilních bílkovin, a to hlavně chitinázy při 55 °C a thaumatinu podobných proteinů při teplotě 56 – 61 °C. Ohřev vína na 90 °C po dobu 1 hodiny a zchlazení po dobu 6 hodin v chladícím zařízení, denaturovalo i poměrně stálý enzym invertázu, která je také zodpovědná za termolabilitu bílkovin v lahvích a denaturuje při teplotě 81 °C. Teploty denurací určil ve své publikaci Falconer se svým týmem (FALCONER et al., 2010). Nejvíce termolabilních bílkovin při tepelných testech obsahovalo víno vyrobené oxidativní metodou bez přídavku oxidu siřičitého, a to „Veltlínské zelené“ z Vinařství Holánek. Avšak tyto metody byly časově velice náročné. Statisticky bylo prokázáno, že nejmenší chybu měla metoda pomalého ohřevu.

Z metod, při kterých bylo použito kyselin k vysolení termolabilních bílkovin, byl výsledkům tepelných testů nejpodobnější test 10% kyselinou sulfosalicylovou, při kterém bylo vysoleno podobné množství termolabilních bílkovin jako při tepelných testech s malou časovou náročností, kdy do 22 minut víme výsledky obsahu termolabilních bílkovin a nemusíme čekat hodiny jako při tepelných testech. Statisticky svou přesností byla tato metoda na druhém místě. Až na rozdílnost těchto pokusů mezi vínem vyrobeným bez přidání oxidu siřičitého a vínem s přídavkem oxidu siřičitého. Oba kyselinové testy i s taninovým testem, etanolovým testem a pěnovou zkouškou vykazovaly nejvyšší obsahy termolabilních bílkovin u vína s přídavkem oxidu siřičitého, a to „Veltlínského zeleného“ vyrobeného reduktivní metodou ve Vinařství Hodeček. Berg a Akiyoshi, zjistili, že test s 55% kyselinou trichloroocetovou je srovnatelný s testem tepelným (BERG a AKIYOSHI, 1961), ačkoliv při tomto pokusu bylo dokázáno, že přesnější je test 10% kyselinou sulfosalicylovou. Nejvyšší obsahy termolabilních bílkovin byly naměřeny turbidimetrickou metodou u taninového testu. Kombinace tanin, etanol a tepelné působení vytvořilo vysoké množství zákalu při turbidimetrickém měření, tudíž je tato metoda pro stanovení termolabilních bílkovin nevhodná. Mohlo by dojít k přechřívání vína při užití této metody. Navíc byl taninový test náročný na přípravu taninového roztoku a celkově trval delší dobu než testy kyselinové. Sarmiento se svým týmem při porovnávání testů uvedli, že taninový test je nevhodný

pro stanovování množství termolabilních bílkovin z důvodu reakce taninu s železem obsaženým ve víně či s dalšími ovlivňujícími faktory, kterými mohou být koncentrace draslíku a mědi, pH a celkový obsah bílkovin (SARMENTO et al., 2000).

Etanolvý test trval po tepelných testech nejdélejší čas a naměřené hodnoty turbidity byly u tohoto testu nejnižší ze všech turbidimetricky měřených testovaných metod, až na měření turbidity u vyčiřených vín, kde tento test způsobil reakci asi se sacharidy či ionty vápníku což vypadalo při měření turbidity, že víno je stále nestabilní, tudíž by také mohlo při tomto testu dojít k přečiření vín stejně jako u taninového testu, který vykazoval vysoké turbidimetrické hodnoty u nevyčiřených vín. Etanolvý test vykazoval vysoké hodnoty turbidity u vyčiřených vín. Sarmento a jeho tým také nedoporučují etanolvou metodu (SARMENTO et al., 2000).

Pěnová zkouška trvala časově nejrychleji, avšak není možnost ji porovnat s ostatními metodami, protože je měřena v jiných jednotkách. Pěnová zkouška prokázala, že nejvyšší obsah termolabilních bílkovin je u „Veltlínského zeleného“ vyrobeného reduktivní metodou s oxidem siřičitým. Avšak nelze ji považovat za přesnou jako testy tepelné či test s kyselinou sulfosalicylovou.

## 5 Závěr

V roce 2016 byly testovány vybrané metody pro stanovení obsahu termolabilních bílkovin v procesu výroby vína. Tyto metody byly mezi sebou porovnány z hlediska přesnosti a rychlosti. Měření probíhalo na Ústavu vinohradnictví a vinařství Zahradnické fakulty v Lednici na Moravě.

Pro rychlé stanovení před lahfováním může být využito rychlé metody s použitím 10% kyseliny sulfosalicylové. Pro přesné stanovení s ohledem na budoucnost vína je však nejvhodnější tepelný test s ohřevem na 60 °C po dobu čtyř hodin a následným zchlazením testovaného zahřátého vzorku vína na 4 °C po dobu 6 hodin. Tento test je vhodnější spíše pro vína uchovávaná ve skladovacích zařízeních bez velkých výkyvů teplot. Také tepelný test s ohřevem vína na 90 °C po dobu jedné hodiny s následným zchlazením testovaného vzorku na 4 °C po dobu 6 hodin, se hodí pro vína, u kterých není známá budoucnost, a mohou se po nějakou dobu skladovat v nestandardních podmínkách, při kterých může dojít k vyšším teplotním výkyvům.

Při této diplomové práci bylo navíc zjištěno, že tepelné testy stanovovaly vyšší obsah termolabilních bílkovin u vín vyráběných oxidativní metodou a ostatní testy stanovovaly vyšší obsah termolabilních bílkovin u vín vyráběných reduktivní cestou.

Budoucnost metod spočívá v imunologických testech, při kterých dojde k přímé detekci PR proteinů zodpovědných za zákal, a to hlavně thaumatinu podobných proteinů a chitinázy, které budou ihned po zjištění jejich koncentrace přepočteny na dávku daného bentonitu, což povede k optimalizaci dávek bentonitu, rychlému provedení detekce i čiření a spokojenosti producenta i zákazníka.

## 6 Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá analytickými metodami pro stanovení obsahu termolabilních bílkovin v procesu výroby vína a jejich porovnáním. Na začátku byla prostudována literatura týkající se termolabilních bílkovin, metod stanovení a jejich vlivu na koloidní stabilitu vína. Vybrané analytické metody jsou zde popsány z hlediska přesnosti a rychlosti. V závěru jsou vybrány a doporučeny metody vhodné pro vinařskou praxi.

Předmětem pokusu bylo srovnání různých analytických metod vhodných pro stanovení obsahu termolabilních bílkovin. Měření probíhalo na Ústavu vinohradnictví a vinařství Zahradnické fakulty v Lednici na Moravě, a to turbidimetricky měřitelnými metodami jako jsou tepelné testy s využitím teplot 90 °C a 60 °C s různou délkou působení, kyselinové testy s využitím kyseliny sulfosalicylové a trichloroctové a také taninový a etanolový test. V další skupině byla pouze metoda turbidimetricky neměřitelná a to pěnová zkouška.

Klíčová slova: termolabilní bílkoviny, analytické hodnocení, tepelné testy, kyselinové testy, taninový test, etanolový test, pěnová zkouška.

## **7 Résumé**

This diploma thesis explores analytic techniques used to determine the amount of thermolabile proteins in wine making processes. It also includes the comparison of applied analytic techniques. The analysis was preceded by the study of available sources dealing with thermolabile proteins, methods of assessment and the influence of thermolabile proteins on the colloidal stability of wine. The applied analytic techniques were assessed in the aspect of accuracy and speed. At the end of the thesis there is the list of reference suitable for wine making processes.

In the experimental part I compared different analytic techniques used to determine the amount of thermolabile proteins. The measurements took place at the Institute of Viniculture and Viticulture at the Faculty of Horticulture in Lednice, South Moravia. We used turbidimetric measurable methods, such as heat-cold testing with the temperature of 90 °C and 60 °C for different time range. We also did acidic test with sulfosalicylic acid, trichloroacetic acid, and also taninn and ethanol test. The later testing involved just turbidimetric unmeasurable technique, in the form of a foam test.

Key words: thermolabile proteins, analytic techniques, heat-cold test, acid test, taninn test, ethanol test, foam test.



## 8 Seznam použité literatury

BALÍK, Josef. *Vinařství: Návodů do laboratorních cvičení*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2006, 96 s. ISBN 80-715-7933-5.

BENTOTEST REAGENT. AUSTRALIA: Chemwatch Material Safety Data Sheet (REVIEW). In: *CHEMWATCH 4642-80*. Dromana: Vintessential Laboratories, 2010, číslo 3.

BERG, H. W. AND AKIYOSHI, M. 1961. Determination of Protein Stability in Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* Vol. 12. Pp. 107-110.

Biuretová reakce. In: *STUDYBLUE: Biuret test for protein* [online]. STUDYBLUE, 2012 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <https://classconnection.s3.amazonaws.com/203/flashcards/48203/jpg/biuret1341266703720.jpg>

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Cabernet Sauvignon. *Znalec vín: Encyklopedie vína, vinařství a vinohradnictví* [online]. Valtice, 2016 [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: <http://www.znalecvin.cz/cabernet-sauvignon/>

CARR, Steven. Horizontální elektroforéza. In: *MEMORIAL UNIVERSITY of NEWFOUNDLAND: Genetics, Evolution, and Molecular Systematics Laboratory* [online]. Kanada: Department of Biology, 2005 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: [https://www.mun.ca/biology/scarr/MGA2\\_14-10.jpg](https://www.mun.ca/biology/scarr/MGA2_14-10.jpg)

Denaturace bílkovin. In: *Biochemie přednášky: Vlastnosti a stanovení bílkovin* [online]. Brno: MENDELU, 2016 [cit. 2016-05-08]. Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty2/vseo/files/58/5396.jpg](http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/58/5396.jpg)

Diagram biuretické reakce. In: *ThermoFisher SCIENTIFIC: Chemistry of Protein Assays* [online]. Waltham, Massachusetts: ThermoFisher SCIENTIFIC, 2015 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein->

biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-protein-assays/\_jcr\_content/MainParsys/image\_3363.img.gif/1437615227860.gif

ESTERUELAS , MIREIA, et al. Comparison of methods for estimating protein stability in white wines. *American journal of enology and viticulture*, 2009, 60.3: 302-311.

FALCONER, Robert J., Matteo MARANGON, Steven C. VAN SLUYTER, Karlie A. NEILSON, Cherrine CHAN a Elizabeth J. WATERS. Thermal Stability of Thaumatin-Like Protein, Chitinase, and Invertase Isolated from Sauvignon blanc and Semillon Juice and Their Role in Haze Formation in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*[online]. 2010, **58**(2), 975-980 [cit. 2016-05-04]. DOI: 10.1021/jf902843b. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf902843b>

FARKAŠ, Ján. *Biotechnológia vína*. Bratislava: Alfa, 1983

GIRIBALDI, MARZIA, et al. Analysis of protein changes during grape berry ripening by 2-DE and MALDI-TOF. *Proteomics*, 2007, 7.17: 3154-3170.

HPLC: L-3000 HPLC. In: *THASAR: technology is our playground* [online]. Italy: RIGOL, 2011 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: Zdroj: <http://www.thasar.com/cms/images/rigol/hplc.jpg>

HSU, Juinn-Chin; HEATHERBELL, David A. Heat-unstable proteins in wine. I. Characterization and removal by bentonite fining and heat treatment. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1987, 38.1: 11-16.

CHAGAS, Ricardo, Luísa M. FERREIRA, César A.T. LAIA, Sara MONTEIRO a Ricardo B. FERREIRA. The challenging SO<sub>2</sub>-mediated chemical build-up of protein aggregates in wines. *Food Chemistry* [online]. 2016, **192**, 460-469 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.052. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615010626>

KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *ZÁKLADY KOLOIDNÍ CHEMIE*. 1. Olomouc: KATEDRA FYZIKÁLNÍ CHEMIE PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITA PALACKÉHO, 2007.

LIRA, E., et al. (2015). "Impact of Bentonite Additions during Vinification on Protein Stability and Volatile Compounds of Albarino Wines." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**(11): 3004-3011.

MARANGON, M., Van SLUYTER, S. C., WATERS, E. J., & MENZ, R. I. (2014). Structure of Haze Forming Proteins in White Wines: *Vitis vinifera* Thaumatin-Like Proteins. *PLoS ONE*, 9(12), e113757. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0113757>

VIALATTE, Martin. *Protein blotting: Determination thermolabile protein*. 2016.

NIELSEN, S. *Food analysis laboratory manual*. 2nd ed. London: Springer, c2010, ix, 177 p. Food science text series. ISBN 978-144-1914-620.

POCOCK, K. F. and RANKINE, B. C. 1973. Heat test for detecting protein instability in wine. *Australian Wine Brew. Spirits Rev.* 91(5): 42-43.

POCOCK, K.F. a E.J. WATERS. Protein haze in bottled white wines: How well do stability tests and bentonite fining trials predict haze formation during storage and transport? *Australian Journal of Grape and Wine Research* [online]. 2006, **12**(3), 212-220 [cit. 2016-03-30]. DOI: 10.1111/j.1755-0238.2006.tb00061.x. ISSN 1322-7130. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00061.x>

*Protein Blotting Guide: A Guide to Transfer and Detection*. Third Edition. Bio-Rad Laboratories, Inc., 2015.

Ricardo B FERREIRA, Maria A PIÇARRA-PEREIRA, Sara MONTEIRO, Virgílio B LOUREIRO, Artur R TEIXEIRA, The wine proteins, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 12, Issue 7, July 2001, Pages 230-239, ISSN 0924-2244, [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00080-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00080-2).

RIBÉREAU-GAYON, Pascal, Denis DUBOURDIEU a Bernard DONÈCHE. *Handbook of enology*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, 2006, 2 v. ISBN 0470010371.

SALZMAN R A, TIKHONOVA I, BORDELON B P, HASEGAWA P M, BRESSAN R A. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol.* 1998;117:465–472.

SARMENTO, M.R, J.C OLIVEIRA, M SLATNER a R.B BOULTON. Influence of intrinsic factors on conventional wine protein stability tests. *Food Control* [online]. 2000, **11**(6), 423-432 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1016/S0956-7135(00)00004-9. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713500000049>

SARRY, Jean-Emmanuel, Nicolas SOMMERER, François-Xavier SAUVAGE, Alexis BERGOIN, Michel ROSSIGNOL, Guy ALBAGNAC a Charles ROMIEU. Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp. *PROTEOMICS* [online]. 2004, **4**(1), 201-215 [cit. 2016-03-29]. DOI: 10.1002/pmic.200300499. ISSN 1615-9853. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.200300499>

SAUVAGE, Francois-Xavier, Benoit BACH, Michel MOUTOUNET a Aude VERNHET. Proteins in white wines: Thermo-sensitivity and differential adsorption by bentonite. *Food Chemistry* [online]. 2010, **118**(1), 26-34 [cit. 2016-03-30]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.080. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609002726>

SEDLO, Jiří a Ivana LUDVÍKOVÁ. *Přehled odrůd révy 2014*. Velké Bílovice: Svaz vinařů ČR ve spolupráci s ÚKZÚZ, 2014. ISBN 978-80-903534-7-3.

SEILNACHT, Thomas. Xanthoprotein-Test: Aromatische Eiweiße nachweisen. In: *Seilnacht: Naturwissenschaften unterrichten* [online]. Bern: Seilnacht [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <http://www.seilnacht.com/Lexikon/xantho.JPG>

SKALNÍKOVÁ, Helena. Princip imunologických metod. In: *ŽIVA: Proteinová sekrece buněk savců aneb jak si buňky povídají a jak jim naslouchat* [online]. Praha: Divize Nakladatelství Academia, 2013 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <http://ziva.avcr.cz/img/ziva/art2/lrg/proteinova-sekrece-bunek-savcu-aneb-jak-si-bunky-p-2.jpg>

SMITH, Nick. Heat stability testing. In: *MIDWEST WINE PRESS: THE ART AND BUSINESS OF WINEMAKING IN THE HEARTLAND* [online]. Chicago: Midwest Wine Press, 2012 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <http://midwestwinepress.com/2012/06/20/heat-stability-testing/>

ŠOTKOVSKÝ, Petr. *Potravinová alergie na proteiny pšeničné mouky*. [Food allergy to wheat flour proteins]. Praha, 2012, Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí závěrečné práce: Doc. RNDr. Ludmila Tučková, DrSc.

TABILO-MUNIZAGA, Gipsy, Trudy Ann GORDON, Ricardo VILLALOBOS-CARVAJAL, Luis MORENO-OSORIO, Fernando N. SALAZAR, Mario PÉREZ-WON a Sergio ACUÑA. Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on the protein structure and thermal stability of Sauvignon blanc wine. *Food Chemistry* [online]. 2014, **155**, 214-220 [cit. 2016-03-30]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.01.051. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614000727>

TAVORMINA, Salvatore. BIOL 1406: PreLab 8b.1. In: *AUSTIN COMMUNITY COLLEGE: BIOLOGY* [online]. Texas, 2009 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <http://www.appstate.edu/~rosea/images/Bradford.jpg>

Turbidimetr: Turb 550IR. *Fisher Scientific: Part of Thermo Fisher Scientific* [online]. Pardubice, 2012 [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: <http://www.thermofisher.cz/produkty/turbidimetr-turb-550ir>

VACEK, Lubor a Marie VALEŠOVÁ. *Organická chemie: Cvičení pro posl. fak. agronomické a zahradnické*. 1. vyd. Praha: SPN, 1992, 110 s. ISBN 80-7157-016-8.

Veltlínské zelené. *Znalec vín: Encyklopedie vína, vinařství a vinohradnictví* [online]. Valtice, 2016 [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: <http://www.znalecvin.cz/veltinske-zelene/>

Vertikální polyakrylamidová gelová elektroforéza. In: *BIO RAD: Protein Electrophoresis Methods* [online]. Rakousko: BIO RAD, 2016 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: [http://www.bio-rad.com/webroot/web/images/lsr/solutions//technologies/protein\\_electrophoresis\\_blotting\\_and\\_imaging/protein\\_electrophoresis/technology\\_detail/pet11\\_img1.jpg](http://www.bio-rad.com/webroot/web/images/lsr/solutions//technologies/protein_electrophoresis_blotting_and_imaging/protein_electrophoresis/technology_detail/pet11_img1.jpg)

VINCENZI, Simone; POLESANI, Marianna; CURIONI, Andrea. Removal of specific protein components by chitin enhances protein stability in a white wine. *American journal of enology and viticulture*, 2005, 56.3: 246-254.

WATERS E.J., WALLACE W., WILLIAMS P.J.. Heat haze characteristics of fractionated wine proteins. *Am. J. Enol. Vitic.* 1991; 42(2): 123–127.

WATERS, E. J., WALLACE, W., & WILLIAMS, P. J. (1992). Identification of heat-unstable wine proteins and their resistance to peptidases. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, 1514±1519.

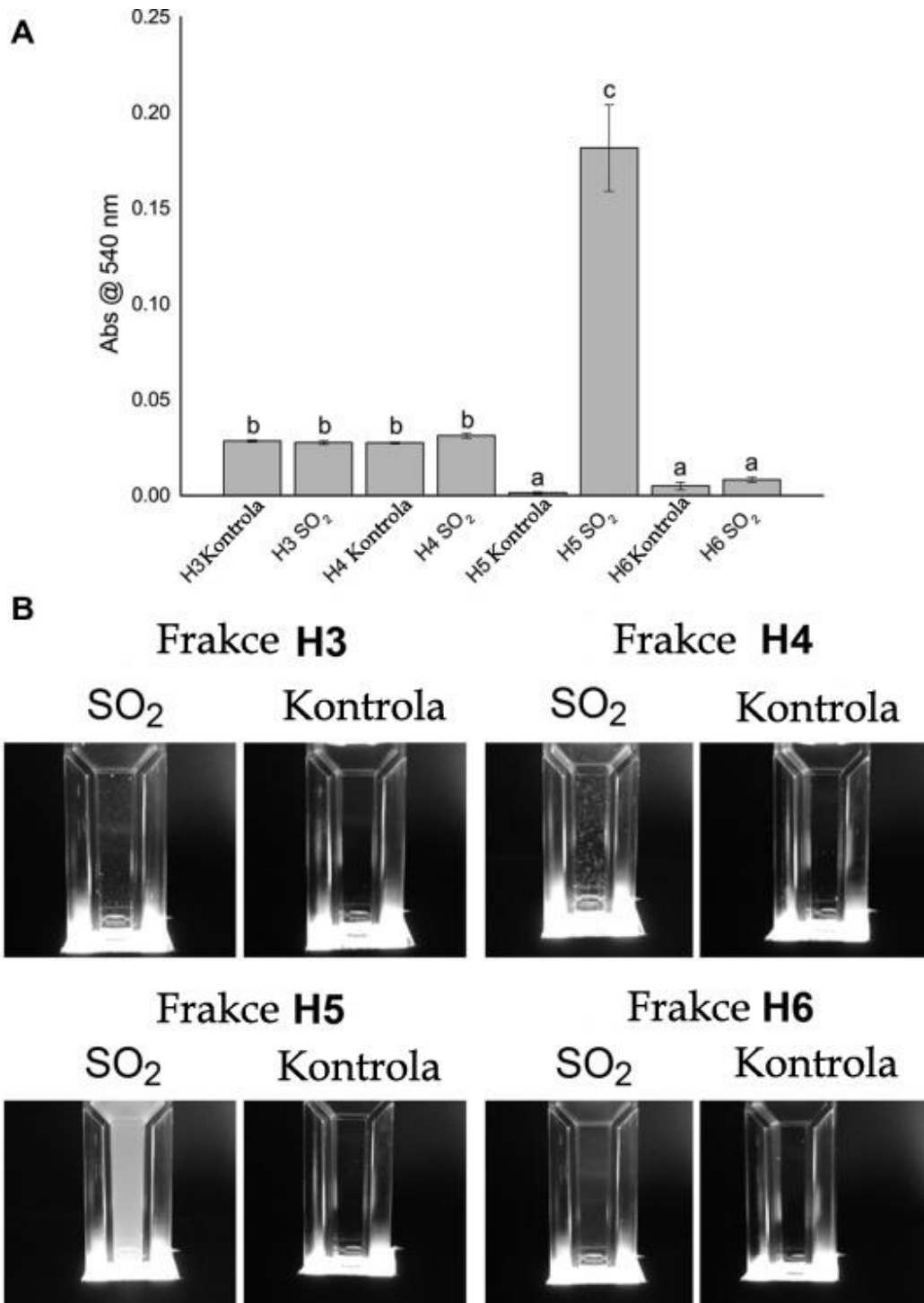
WATERS E.J., SHIRLEY N.J., WILLIAMS P.J. (1996) Nuisance proteins of wine are grape pathogenesis-related proteins. *J Agric Food Chem* 44:3–5.

WATERS, E.J., G. ALEXANDER, R. MUHLACK, K.F. POCOCK, C. COLBY, B.K. O'NEILL, P.B. HØJ a P. JONES. Preventing protein haze in bottled white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* [online]. 2005, **11**(2), 215-225 [cit. 2016-03-29]. DOI: 10.1111/j.1755-0238.2005.tb00289.x. ISSN 1322-7130. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00289.x>

ZIMA, Jan. *Genetické metody v zoologii*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 239 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0795-6.

ZOECKLEIN, B., K. C. FUGELSANG, B. H. GUMP, and F. S. NURY. *Production Wine Analysis*. 475 pp. Van Nostrand Reinhold, New York (1990).

## 9 Přílohy



Obrázek 1 Rozvoj zákalu po tepelném testu. Obrázek byl pozměněn (Chagas et al., 2016).

(A) Rozvoj zákalu po tepelném testu izolovaných frakcí HIC (upraveno na  $100 \text{ mg.l}^{-1}$ ) ve dvou modelových vínech. Kontrola neobsahovala žádné přidané  $\text{SO}_2$  a víno s  $\text{SO}_2$  obsahovalo dávku  $120 \text{ mg.l}^{-1}$  celkového  $\text{SO}_2$

(přidaného jako  $\text{NaHCO}_3$ ). H3 - H6 ukazují proteinové frakce získané HIC separací.

(B) Vizualizace oparu vzniklého po zkoušce tepelné stability HIC frakce H3 - H6 modelových vín s  $\text{SO}_2$  a bez  $\text{SO}_2$ . Kyvety na obrázku odpovídají kyvetám experimentu popsaného v (A).