

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Využití ^1H NMR k určení kvality a geografického původu
vína a piva**

Bakalářská práce

Adéla Jirušová
Výživa a potraviny

Doc. Ing. Jaroslav Havlík, PhD.

©2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Využití ^1H NMR k určení kvality a geografického původu vína a piva" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.7.2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za odborné vedení, užitečné rady, čas a trpělivost, které mi poskytoval během zpracování mé bakalářské práce.

Využití ^1H NMR k určení kvality a geografického původu vína a piva

Souhrn

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je rozvíjející se perspektivní metoda využívána k detekci falšování potravin nebo určení geografického původu. Jednou z nejčastěji falšovaných potravin je víno. NMR spektra vína jsou výsledkem odezvy 30–50 sloučenin, mají vysokou reprodukovatelnost a přesnost a jejich vzájemné poměry a zastoupení mohou být markerem určité odrůdy nebo oblasti. České pivo je zase známkou chráněného zeměpisného označení a existuje zde možnost zneužití nebo podvodu. Jen málo vědeckých studií bylo zaměřeno na využití NMR v určení geografického původu piva.

Klíčová slova: vinná réva, víno, geografický původ, NMR metabolomika

Use of ^1H NMR in assessment of quality and geographic origin of wine and beer

Summary

Nuclear magnetic resonance (NMR) is an evolving perspective method used to detect food adulteration or determination of geographical origin. One of the currently adulterated foods is wine. The NMR spectra of the wine are the result of a repercussions of 30–50 compounds, have high reproducibility and accuracy, and their relative ratios and quantities can be markers for determination of varieties or regions. Czech beer is a trademark of a protected geographical indication (PGI) and the possibility of abuse or fraud. Few scientific studies have focused on the use of NMR in determining the geographical origin of beer.

Keywords: grape wine, wine, geographical origin, NMR metabolomics

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce.....	9
3	Falšování a bezpečnost potravin.....	10
3.1	Autentizace potravin	10
3.2	Bezpečnost potravin	12
3.2.1	Nukleární magnetická rezonance (NMR)	12
3.2.2	Využití NMR v potravinářství	13
3.2.2.1	Příprava vzorků před analýzou NMR.....	14
3.2.3	Chráněné zeměpisné označení/ Chráněné označení původu	15
3.3	Víno.....	16
3.3.1.1	Chemické složení vína	17
3.3.1.2	Fermentace vína	18
3.3.1.3	Vinařské evropské zóny	19
3.3.1.4	Významné vinařské státy v Evropě.....	19
3.3.1.5	Chaptalizace	22
3.3.1.6	NMR analýza vína.....	23
3.3.1.7	Falšování vína	30
3.5	Pivo	32
3.5.1	České pivo.....	32
3.5.2	Chemické složení piva	33
3.5.3	Druhy piv	33
3.5.3.1	Piva spodně kvašená	33
3.5.3.2	Piva svrchně kvašená	34
3.5.4	Trapistická piva.....	35
3.5.5	NMR analýza piva	35
4	Závěr	43
5	Citovaná literatura.....	44

1 Úvod

Falšování potravin a potravinová bezpečnost jsou pojmy v posledních letech hodně diskutované a Evropská Unie a různé organizace se snaží těmto praktikám co nejvíce zabránit. Falšování potravin a potravinové podvody mají pozitiva pouze pro výrobce dané komodity, kteří díky tomuto dosahují vyšších zisků. Vyšších zisků může dosáhnout například pančováním alkoholu či medu, prodáváním vína, olivových olejů nižší kvality či jiného místa původu, než je deklarováno na etiketě. Zákazník zde tedy platí víc za potravinu jiné kvality, než očekával. Krom finančního znevýhodnění, může u zákazníka propuknout alergie na složku, která byla přidána do potraviny. Proto se v posledních letech začali využívat analytické a fyzikálně-chemické metody pro odhalování těchto podvodů, kdy v relativně krátkém čase můžeme tyto podvody odhalit. Mezi metody, které se dostávají do popředí patří nukleární magnetická rezonance (NMR), která neničí analyzovaný vzorek. Z NMR spektra lze rozpoznat jak kvalitativní, tak kvantitativní zastoupení chemických sloučenin. NMR lze využít i při určování regionální pravosti, Chráněného zeměpisného označení či Chráněného označení původu.

Při výrobě vína má každá vinařská oblast charakteristický terroir, který se následně přenesou do výsledného produktu. Na kvalitu vína má největší vliv zvolená odrůda, terroir, doba slunečního svitu, použití kvasinek při výrobě, místo a metoda zrání. Po provedení analýzy tak získáme jedinečný otisk vína z dané lokality a lze tak při porovnání vín, určit místa jejich původu. S využitím NMR je také možnost rozeznávat jednotlivé odrůdy, protože pro každou odrůdu je specifické trochu jiné zastoupení chemických látek.

U piva je tomu podobně. Sládcí z velké části využívají lokální suroviny pro výrobu piva a lze tak učit regionální původ piva. Pomocí NMR se dají rozlišit piva svrchně a spodně kvašená, mezi nimiž jsou také určité rozdíly v zastoupení chemických sloučenin. U piva je důležitá ochranná známka „České pivo“. Pivo s tímto označením musí být vyrobeno za přesně definovaného technologického postupu z daných surovin a musí být uvařeno na území České republiky. NMR má předpoklady sloužit jako nástroj na kontrolu původu Českého piva.

2 Cíl práce

Cílem práce bylo zpracování rešerše na zhodnocení potenciálu NMR k určení kvality a geografického původu piva a vína. Byl sestaven přehled hlavních vědeckých přístupů, parametrů a možností metody.

3 Falšování a bezpečnost potravin

Falšování potravin je problémem již od samotného počátku civilizace. Nejen, že snižuje kvalitu potravin, ale má také negativní dopady na zdraví. Autenticita potravin a obsah cizorodých látek potravinářských výrobků je důležitá pro posuzování kvality a slouží k ochraně spotřebitele před podvodnými činnostmi výrobců. Obavy o bezpečnost potravin zajistily rozvoj technik, které umožňují sledovat cizorodé látky, a to pomocí metod molekulárních, fyzikálních, biochemických i imunologických. (Bansal, 2016)

Informovanost veřejnosti o těchto problémech roste, stejně tak jako se rozrůstají podkategorie falšovaných potravin. Jako jedním z důvodů falšování může být pro výrobce vidina vyšších zisků, které ale mohou mít negativní zdravotní dopad na spotřebitele. Hlavními rysy falšovaných potravin je nedodržování zákonů, klamání zákazníků, záměrné podvádění, a to vede k vyšším ziskům výrobce. (Hong, 2017)

Potraviny a potravinářské suroviny, které jsou často spojovány s falšováním potravin se dají rozdělit do šesti kategorií. Do první kategorie „Potraviny živočišného původu a mořské plody“ patří ryby, mořské plody, mléko, výrobky z něj, maso a výrobky z něj. Druhou kategorií jsou „Oleje a tuky“, kam patří olej. Dále „Nápoje, ovocné šťávy, káva, čaj a alkoholické nápoje“, kam patří ovocné šťávy, víno a ostatní alkoholické nápoje, káva a čaj. Čtvrtou skupinou jsou „Sladidla a koření“, kam patří med a koření. Pátou skupinou jsou „Obiloviny, výrobky z nich a luštěniny“ a poslední je skupina „Ostatní“ kam jsou zařazeny biopotraviny. Nikde však není uvedeno, jakých čísel dosahují podvody s potravinami na celosvětové úrovni. (Hong, 2017) Kuballa et al. ve svém článku z roku 2018 uvádí informace ze statistik United States Pharmacopeial Convention, kde poukazují na nejčastěji falšované potraviny. Z 16 % je to olivový olej, ze 14 % mléko a ze 7 % med. (Kuballa, 2018)

Falšování alkoholických nápojů se může provádět nejen ke zvýšení obsahu alkoholu pomocí levnějších zdrojů cukrů a škrobu kromě hroznů nebo ovoce. (tzv. Chaptalizace – přislazení moštu před kvašením vína (Parga-Dans, 2017))

Suroviny používané v potravinářském průmyslu, mohou pocházet z různých světových zemí nebo jednotlivé komponenty mohou pocházet z jednotlivých dceřiných firem velkých nadnárodních společností. Je tak proto velmi obtížné objevit a vysledovat zdroj neúmyslné kontaminace a je potřeba poté najít souvislost s bezpečností a hygienou potravin. Nejhorší odhalitelná kontaminace a záměrné falšování je u vysoce průmyslově zpracovaných potravin, kde do výroby vstupují jednotlivé komponenty od jednotlivých subdodavatelů. (Hong, 2017)

3.1 Autentizace potravin

Autentičnost potravin se stala hlavním problémem pro všechny strany zapojené do potravinářského průmyslu, do těchto stran spadají zemědělci, producenti, dodavatelé, maloobchodníci a zákazníci. Na všech těchto úrovních výrobních a distribučních procesů od primárních surovin až po hotové produkty. Z pohledu legislativy byly stanoveny kvalitativní standardy. Včetně označení kvality, které u každého produktu specifikují hlavní složky. Z ekonomického pohledu je autentizace nutná, aby se dalo zabránit nekalé soutěži, která může ohrozit trh a s tím i regionální či národní ekonomiku. Vzhledem k těmto skutečnostem se vědci

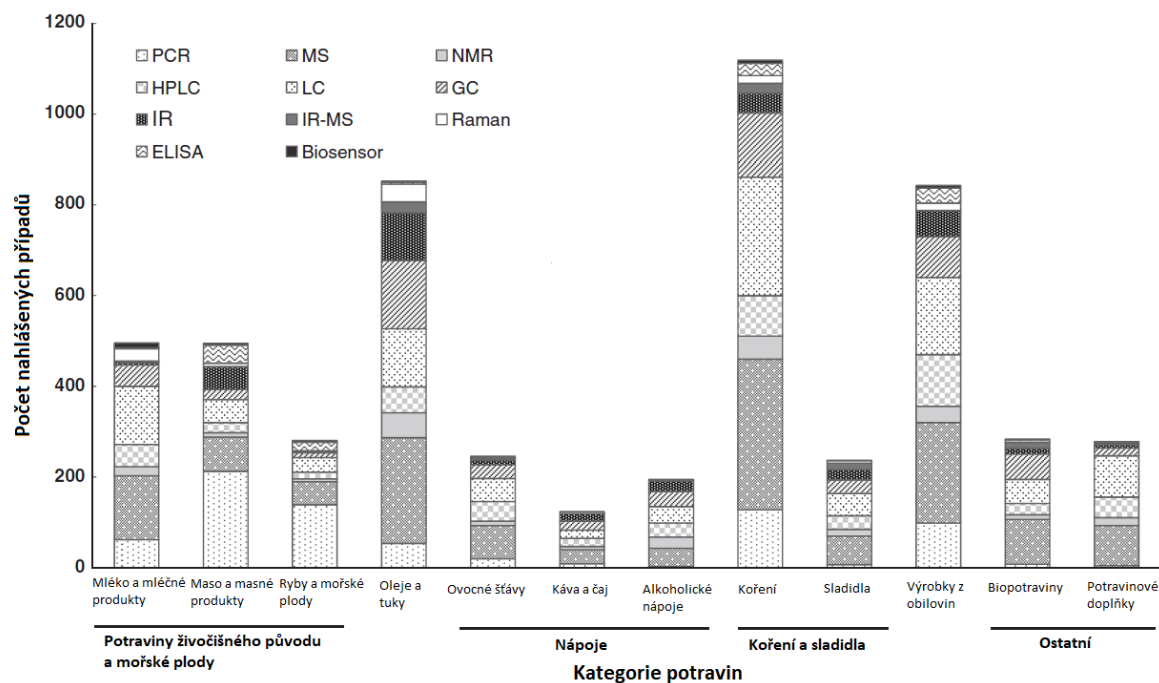
zapojili do výzkumu a vývoje analytických metod, které by měly být rychlé a přesné k snadnému odhalení falšovaných potravin. (Hong, 2017)

Používá se mnoho technik k detekci podvodných a falšovaných potravin. První z kategorií jsou chromatografické analýzy – tenkovrstvá chromatografie (TLC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC), kapalinová chromatografie (LC) a metody založené na hmotnostní spektrometrii (MS). (Hong, 2017) Pomocí GC-MS a chemometrické analýzy lze určit jednu z důležitých vlastností vína, kterou je aroma, dále je schopné detekovat těkavé látky. (Rochfort, 2010)

Druhou kategorií jsou elektroforetické metody – elektroforéza na dodecyl sulfát – polyakrylamid sodný (SDS-PAGE), řetězová polymerázová reakce (PCR), polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP), náhodná amplifikovaná polymorfni DNA (RAPD), amplifikovaný polymorfismus délky fragmentů (AFLP) a jednoduché opakování sekvence (SSR).

Třetí a zároveň předposlední kategorií jsou spektroskopické metody, které zahrnují – infračervenou spektroskopii (IR), blízkou (NIR) a středně (MIR) červenou spektroskopii, Infračervená Fourierova transformace (FTIR), Ramanova spektroskopie, nukleární magnetická rezonance (NMR), mírně specifická frakcionace přírodních izotopů (SNIF–NMR), emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP–OES). Poslední kategorií jsou immunoanalýzy (ELISA). (Hong, 2017)

Při získávání metabolických profilů rostlinných materiálů se osvědčily metody jako byla HPLC, MS, FTIR, UV fluorescence, kombinace GC-MS ovšem velký potenciál měla metoda NMR, nejvíce ^1H NMR. (Pereira, 2005)



Obrázek 1. Kategorie falšovaných potravin a jejich počty a způsoby detekce (přejato z Hong, 2017)

Dle obrázku číslo 1 je vidět, že největší zastoupení zaujímá MS a to s 20,6 %, PCR zaujímá 18,5 % a HPLC zaujímá 11,6 %. MS je široce používána pro většinu potravinových

kategorií a je také současně nejčastěji používanou metodou při analýzách koření, extraktů, obilovin, zrn a luštěnin. HPLC a GC se také ve značné míře používá pro koření, oleje a biopotraviny. Na určení pravosti olejů, obilovin, obilnin, alkoholických nápojů a ovocných šťáv se využívá NMR. Pro živočišné produkty jako je maso a masné výrobky, mléko a mléčné výrobky, ryby a mořské plody převládá použití PCR. MS, HPLC a LC se využívají pro analýzy ovoce, ovocných šťáv a sladidel. IR spektroskopie, Raman, ELISA a biosenzory se využívají v zanedbatelném množství. (Hong, 2017)

3.2 Bezpečnost potravin

Potravinová bezpečnost existuje za předpokladu, že všichni lidé mají ekonomický, sociální a fyzický přístup k dostatečnému množství bezpečného a výživného jídla k uspokojení energetické potřeby a živin ke zdravému životu. V oblasti potravinářského průmyslu se prolíná zemědělství se širokým spektrem institucí, technologií a postupů, které uvádějí potraviny na trh. Podílejí se na jejich výrobě, přepravě, dostupnosti a způsobu konzumace. (Capone, 2014) Bezpečnost potravin má za úkol zajistit ochranu zdraví spotřebitelů, jež vychází z evropské potravinové politiky. Do této oblasti je zahrnuta výrobní hygiena potravin, kontrolní mechanismy, dohlížení na potravní řetězce a bezpečnost krmiv. Tvorbou legislativy, průběžnými a důkladnými kontrolami dochází k zabezpečení kvality potravin. (Eagri.cz)

Činnost potravinářských provozů je rozdělena do čtyř kategorií, a to na výrobu potravin, zpracování a balení, distribuce a maloobchod s potravinami a konzumace potravin. Klade se důraz na souvislosti a vazby mezi udržitelností a bezpečností potravin. Je zde velmi silná vazba mezi potravinami a nutriční bezpečností, zodpovědnou za udržitelnost životního prostředí a větší čestnost v potravinářském managementu. (Capone, 2014)

Autentizace potravin je důležitá k zajištění potravinové bezpečnosti, kvality potravin a ochrany spotřebitele. Současně je také důležitá ke kontrole dodržování legislativy, mezinárodních norem a dalších směrnic. (Hong, 2017)

3.2.1 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

NMR spektroskopie se dostává více do popředí při analýzách různých směsí s jedním velkým aplikačním polem, zejména při analýzách potravin. NMR má jedinečné vlastnosti jako je nedestruktivní měření, výborná selektivita a schopnost současného stanovení mnoha sloučenin v komplexních směsích bez potřeby separace či jiné úpravy vzorku. (Monakhova, 2011) ^1H NMR spektra jsou získávána využitím presaturační sekvence k potlačení signálu vody pomocí selektivního ozařování s nízkou silou při frekvenci vody během relaxačního zpoždění, někdy uváděno pod názvem noesyprerat. (Viggiani, 2008) (Son, 2008)

NMR spektroskopie je známou analytickou metodou, která se využívá pro rozpoznání mikro a makro molekul. Protonové ^1H NMR spektrum s chemickým posunem a vazbovými konstantami, poskytuje také informace o kvantitativním vztahu mezi intermolekulárními a intramolekulárními rezonancemi. Jednou z velkých výhod kvantitativní NMR (kvantitativní – qNMR) je její primární analytická charakteristika, díky čemuž jí lze využít pro kvantitativní odhad čistoty sloučenin bez použití specifického referenčního standardu. Aplikace qNMR na jiná jádra, jako je ^{31}P či ^{13}C , je omezená v důsledku nízké citlivosti nebo přirozeně nízkého

výskytu. Pokrok v posledních letech, který se zabýval vývojem magnetů s vysokým polem a technologií kryosond, výrazně snížil mez detekce (LOD). Poskytl tak možnost analyzovat vzorky v nízkých koncentracích v metabolomice, léčivech ale i v přírodních produktech. Metabolomika založená na NMR poskytuje relativní i absolutní kvantifikaci několika metabolitů ve vzorcích biologického původu, bez separace jednotlivých složek. Spektroskopie v kombinaci s qNMR je často využívána v toxikologii při kontrolách životního prostředí, při testu toxicity léčiv, bakteriálního metabolismu, metabolismu léčiv a také při vlivu stresu a výživy na člověka. (Bharti, 2012) NMR s vysokým rozlišením se stalo upřednostňovanou technikou pro analýzu nápojů na úrovni molekul, díky vývoji vysoko rozlišovacích NMR spektrometrů (500-900 MHz). S možností zaznamenávat dvourozměrná či více rozměrná spektra. K potlačení silných signálů se využívá speciálních sond, jako je nano sonda pro malé objemy vzorků a kryogenní sondy. (Kidrič, 2008)

3.2.2 Využití NMR v potravinářství

Potraviny jsou složité matrice, které v různých koncentracích obsahují sloučeniny lišící se svými chemickými strukturami i vlastnostmi. Sloučeniny mohou být přírodního charakteru, které jsou obsaženy v primární surovině anebo jsou do potravin přidávány během výroby, či jiném technologickém kroku. (Mannina, 2016a) Největší využití má tato metoda při získávání metabolických profilů ovocných šťáv, džusů, olivového oleje, čaje, piva, vinného moštu a vína. (Pereira, 2005)

Byla sestavena velká Brukerova databáze spekter používaných pro autentizaci potravin, obsahuje více než 29 000 referenčních spekter, více než 19 000 spekter vín a více než 8000 spekter medu. Pomocí této databáze je možné rozpoznat geografický původ, odrůdu a ročník vína. Tato metoda, umí rozpoznat organické látky, jako je například melamin, který se využívá při falšování potravin pro zvýšení obsahu bílkovin. (Kuballa, 2018)

Nukleární magnetická rezonance (NMR) má široké využití při analýzách potravin. Je to důležitý přístroj umožňující studium chemického složení a molekulární dynamiku pevných, kapalných a polotuhých potravinových vzorků. (Sobolev, 2019) Největším pozitivem NMR je, že nepotřebuje přípravu vzorků, nebo separaci složek před samotnou analýzou. (Mannina, 2016b) Je schopna detekovat sloučeniny i v nízkých koncentracích, až v jednotkách mg/L. (Alañón, 2015) NMR je metoda neselektivní a dokáže rozpoznat všechny sloučeniny rostlinných vzorků ve kterých je obsažen proton. Těmito látkami jsou nejčastěji organické sloučeniny – sacharidy, aminokyseliny, aminy, mastné kyseliny, polyfenoly, estery a ethery, organické kyseliny a lipidy. (Pereira, 2005) (Alañón, 2015) Dalším kladným prvkem této metody je, že umí identifikovat sloučeniny i bez existujících standardů. Pokud ale chceme analyzovat konkrétní složku, lze provést selektivní extrakci, kdy dojde ke zvýšení koncentrace testované látky a zabráníme tak interferenci s jinými sloučeninami. (Mannina, 2016a) Velká výhoda NMR spočívá v tom, že není destruktivní a poskytuje více informací. Zejména při určování molekulárních struktur v komplexních směsích je bohatá na velké množství informací. NMR ve spojení s vícerozměrnou statistikou, chemometrickými metodami za účelem extrakce utajených složek a také nabízí nový, výkonný a také účinný přístup k hodnocení metabolických funkcí. K rozpoznávání vzorků se využívají metody, které mohou mapovat vzorek ve více

dimenzích – dvourozměrný (2D) nebo trojrozměrný (3D), čímž se usnadňuje vizualizace dat z inertních vzorků. (Son, 2008) (Lee, 2009)

Metoda NMR může být užitečná pro identifikaci padělků a využívá se také pro charakterizaci potravinových matic z hlediska pravosti a kvality. (Mannina, 2016a) Bohužel, potravinovou pravost nebo falšování potravin, nelze vždy jednoduše vymežit na identifikaci jedné nebo více markerových sloučenin. V některých případech jsou analýzy založeny na kombinaci několika složek nebo na kompletním metabolickém profilu potraviny, který představuje jedinečný vzor charakterizující identitu konkrétní potraviny. (Sobolev, 2019) Při využití statistické vícerozměrné identifikace vzorků se často využívá analýza hlavních komponent (PCA) a v některých případech i částečná diskriminační analýza nejmenších čtverců (PLS–DA). (Son, 2008) V posledních letech bylo využití cílených i necílených metod NMR velmi přínosné v oblasti metabolomiky. (Sobolev, 2019) Hlavní cíl metabolomiky je měřit metabolické reakce v organismech, ale také zlepšit porozumění metabolickým poruchám z biologických tekutin (jako je moč a krevní sérum), či tkání (úroveň toxicity, stravovací návyky). (Hong, 2011)

Při analýze potravin se úspěšně využívá několik necílených metod. Jednou z nich je metabolické profilování, které je často bez separačního kroku a má za cíl identifikaci a kvantifikaci vybraných skupin sloučenin ve vzorku. Další metodou jsou metabolické otisky prstů (fingerprint), které pouze zhodnotí vzorek, ale nerozpoznají jednotlivé specifické metabolity. Poslední z metod, která má nejobsáhlejší přístup zaměřený na identifikaci a kvantifikaci metabolitů je technika známá jako metabolomika. Analyzuje metabolity v biologických kapalných vzorcích a byla také úspěšně využita při analýzách potravin. (Mannina, 2016a)

Metabolomika je také využívána v potravinářském odvětví, nejvíce při výzkumech výživy člověka. Díky těmto studiím byla odhalena změna metabolitů v moči po požití přírodních produktů a došlo k objasnění biologicky aktivních látek v potravinách a jejich vlivu na rozvoj různých nemocí. (Son, 2008) Během studií metabolomu bylo veškeré úsilí věnováno co nejrychlejšímu vývoji analytické metody, která by byla schopna informovat o všech důležitých složkách potraviny. Bylo velmi nepravděpodobné spoléhat jen na jednu analytickou metodu, která by byla schopna odhalit všechny metabolity. Každý vzorek je specifický svou polaritou, rozpustností či svým chromatografickým chováním. Proto bylo za potřebí využít více fyzikálně – chemických metod (například HPLC, MS, GC-MS, NMR). (Pereira, 2005)

3.2.2.1 Příprava vzorků před analýzou NMR

Před samotnou analýzou je jedním z nejdůležitějších kroků správné odebrání vzorku. Potravina je matrice velice složitá, a předpokládá se, že jsou v ní metabolity heterogenně rozložené. Ve většině případů je možné analyzovat jen část potraviny. Proto je vhodné použít vzorek reprezentativní, kdy dojde ke smíchání různých částí vzorku. Dalším důležitým krokem je správné uchování odebraných vzorků, aby si udržely potřebnou kvalitu a složení. Aby nedocházelo k chemickým a enzymatickým degradačním procesům, jsou vzorky zmrazeny v tekutém dusíku a následně jsou uloženy do tmy a chladu. (Mannina, 2016b) Při analýze vína není zapotřebí vzorek extrahovat, například pokud chceme stanovovat fenolové sloučeniny. Je ale také možné vzorek zahustit (odstranit část vody) či jej zlyofilizovat a před samotnou

analýzou se vzorek rekonstruuje pomocí deuterovaného rozpouštědla určeného pro NMR analýzy. (Alañón, 2015) U kvantitativních analýz hraje hodnota pH vzorku významnou roli. Změna pH může způsobit chemický posun požadovaného signálu, což může následně vést k překrývání signálů ve spektru a také ke změně doby relaxace. V metabolomice se doporučuje využívat pH pufrů, které eliminují posuny v NMR spektru způsobené pH. (Bharti, 2012)

U ^1H NMR, HR-MAS NMR a MRI lze analyzovat vzorky tak jak jsou, bez jakékoliv úpravy. Výjimku tvoří kapalné vzorky, kde se testovací protokol dělá na míru dané potraviny. U necílených analýz NMR s kapalnými vzorky jako je olivový olej, ocet, víno a různé ovocné šťávy lze provádět analýzu bez jakékoliv úpravy. U medu je doporučeno před ředění. U pevných potravin je po homogenizaci provedena extrakce rozpouštědly (nejčastěji se používá kombinace methanolu, vody a chloroformu v různých poměrech). U cílené analýzy NMR je výběr extrakčního rozpouštědla velmi důležitý. Roztok kyseliny octové ve vodě je vhodný k extrakci polyfenolů a směs chloroformu, ethylacetátu a 2-butanolu je pro změnu vhodný k extrakci aromatických sloučenin. V rámci soboru analýz je důležité dodržet pH a teplotu, aby mohla být analýza reprodukovatelná. (Mannina, 2016a) Pro získání celkového metabolického otisku vína není potřeba žádný extrakční krok. Vzorky se většinou přímo analyzují s přidáním deuterovaného rozpouštědla. Případně je možné vzorky zlyofilizovat, aby došlo k odstranění přebytečné vody. Před samotnou NMR analýzou se rozpustí v konkrétním rozpouštědle. (Fotakis, 2013)

3.2.3 Chráněné zeměpisné označení/ Chráněné označení původu

Chráněné označení původu může získat potravina jen tehdy, pokud má vazbu na konkrétní zeměpisnou oblast ve třech fázích výroby. A to při produkci, zpracování a přípravě dané potraviny. Pro získání chráněného zeměpisného označení potraviny stačí, aby alespoň jedna fáze výroby (výroba, příprava nebo zpracování) probíhala v dané zeměpisné lokalitě. (Conneely, 2015)

Evropská unie výborně chrání zemědělské produkty s ohledem na jejich vysokou kvalitu a pověst, která může evropským výrobcům pomoci nejen chránit svou kulturní identitu, ale také zajistit si konkurenceschopnost a rentabilitu na rostoucím světovém trhu. Zejména ochranný systém Evropské unie pro označování původu (CHOP) a zeměpisného označení (CHZO) představuje důležitý politický nástroj k zachování charakteristik zemědělských produktů. Označení původu a označení zeměpisné se váže k regionálním faktorům, jako je například místní odrůda, jedinečné prostředí a tradice. (Agostino, 2014)

Okrajově může být chráněné označení původu spojováno s bezpečností potravin, kdy může být tato značka dávana do souvislosti se zárukou kvality. Je známo několik rozsáhlých krizí v oblasti zdraví lidí a zvířat, které vedly k reakcím Evropské unie a členských zemí k důslednějšímu sledování potravin. Jako reakce na obnovu poškozených trhů s potravinami, nastala regulace producentů a míst kde se potraviny vyrábí. Kvalita potravin je dnes dávana do souvislosti s oblastmi jako je například veřejné zdraví, udržitelnost, etické obchodování či ekologické zemědělství. (Conneely, 2015)

Předchůdce označování CHOP/CHOZ se ve vinařství uplatňuje již od šedesátých let prostřednictvím zvláštních ustanovení týkajících se jakostních vín vyráběných ve stanovených regionech (QWPSR – Quality Wines Produced in Specified Regions). Aby mohlo víno nést

toto označení, musí být vyrobeno v určité oblasti a musí splňovat určitá pravidla. Jako například odrůda vinné révy, metody výroby, sensorické vlastnosti, obsah alkoholu a maximální výnos z hektaru vinohradu. Splnění těchto kritérií omezuje flexibilitu při výrobě vína a vinařům způsobuje dodatečné náklady na výrobu. Pozitivem je však zvýšení prodeje takto označených vín a zvyšuje zisk daného vinaře. (Agostino, 2014)

3.3 Víno

Evropská směrnice definuje víno jako výrobek, který byl vyroben výhradně částečným nebo úplným ethanolovým kvašením vinných hroznů. Hrozny mohou být čerstvé, nerozdrcené nebo rozdrcené. Lze také použít hroznový mošt. Víno z hroznů získaných z vinařské zóny A musí obsahovat nejméně 8,5 % objemových alkoholu, v ostatních zónách musí být obsah alkoholu nejméně 9 % objemových.

Nejvyšší obsah alkoholu je omezen na 15 % objemových. Pro tuto horní hranici však existují dvě výjimky. První výjimka platí pro vína s chráněným označením původu, která bez jakéhokoli obohacení můžou překročit hranici 15 % objemových alkoholu. Druhá výjimka platí pro vína, která můžou dosáhnout hranice 20 % objemových alkoholu a byla vyrobena bez jakéhokoli obohacování a pochází z oblastí v Evropské unii určených Komisí Evropské unie.

Obsah kyselin ve víně vyjádřený jako kyselina vinná, která musí být nejméně 3,5 g/L. Víno z hroznového moštu ošetřeného pryskyřicí z borovice halepské (*Pinus halepensis Mill.*) se smí vyrábět výhradně na území Řecka a nese označení Retsina. (č.1308/2013)

Víno je komplexní směs stovek sloučenin, které se podílejí na barevných, chuťových nebo aromatických vlastnostech. Mnoho faktorů ovlivňuje charakteristickou vůni vína. Mezi tyto faktory patří odrůda hroznů, způsob vedení vinohradnictví, výroba a zrání vína, a nakonec i podmínky skladování. (Sumbly, 2014) V Evropě je využíván pojem „terroir“, který v sobě zahrnuje všechny bioklimatologické podmínky jako je podnebí, množství srážek a slunečního svítu, složení půdy na vinohradu a v neposlední řadě i péči vinaře a jeho enologických postupů. Všechny tyto aspekty ovlivňují výslednou kvalitu vína. (Pereira, 2005) U finálního produktu jsou důležitými parametry kvality pocitu, které cítíme v ústech po napití. Důležitá je správná teplota podávání, od které se všechno odvíjí, dále je to samotná chuť její délka, síla těla, kyselost. Dále je důležité zrání vína (například v dubových sudech) i v samotných láhvích. Všechny tyto vlastnosti se odvíjejí od množství těkavých a netěkavých kyselin. (Rochfort, 2010) Enzym glykosidáza napomáhá uvolňovat velké množství aromatických sloučenin, jakou jsou monoterpeny, alifatické sloučeniny a norisoprenoidy. Všechny tyto sloučeniny přispívají k ovocným a květinovým tónům vína. (Sumbly, 2014)

Vína, co nesou na etiketách označení zeměpisného původu tam mají také region původu, odrůdu hroznů a rok sklizně. Víno by také mohlo zahrnovat deskriptory vinařské výroby. Spotřebitelům jsou ale sotva sděleny nějaké informace, které se týkají technologického procesu výroby či enologických postupů. Lze najít jen obecné pojmy používané k popisu samotného vína a informace o obsahu alkoholu. Dále je zde možno najít informaci o obsahu alergenu oxidu siřičitého a to formou „Obsahuje siřičitany“, není však uvedeno množství. (Parga-Dans, 2017)

3.3.1.1 Chemické složení vína

Z chemického hlediska se víno skládá ze stovky různých sloučenin v různých koncentracích. Mezi hlavní složky patří voda, ethanol, glycerol, organické kyseliny, cukry a některé hlavní aminokyseliny. (López-Rituerto, 2012a) To, jaké bude množství a spektrum aminokyselin ve víně ovlivňuje mnoho faktorů. Například metabolická aktivita kvasinek, rozložení bílkovin pomocí enzymů a v neposlední řadě podmínky klimatické a vinařské. Je předpoklad, že rozdílné podmínky mezi vinohrady, ať už je to rozdílným podnebím, polohou vinohradu či ročníkem sklizně a lahvováním, dávají díky tomu rozdílné složení aminokyselin výsledného vína. (Viggiani, 2008) Při sklizni hroznů se sledují kvalitativní parametry jako je obsah cukrů, celková kyselost, pH a obsah fenolových látek. (Pereira, 2005)

Celková kyselost a svíravost vína je ovlivněna množstvím kyseliny octové, maleinové a mléčné. Je důležité poznamenat, že tyto látky jsou silně ovlivněné pH. Přítomnost glycerolu ve víně má účinek na vnímání těkavých látek, sladkost a plnost vína. Množství ethanolu má vliv na vnímání hořkosti a kyselosti vína, také může změnit vnímání viskozity a barvy. Na viskozitu mají vliv i monosacharidy, disacharidy a polysacharidy, které současně ovlivňují sladkost. (Rochfort, 2010) Fotakis et al. zanalyzovali víno, hrozny a vinné listy a identifikovali celkem 80 chemických sloučenin. Jako rozpouštědla použili D₂O, MeOD, MeOD-KH₂PO₄ (při pH = 6). V hroznech identifikovali aminokyseliny – isoleucin, leucin, valin, threonin, alanin, arginin, prolin, glutamin a GABA (kyselina γ -aminomáselná). Poté dva monosacharidy fruktózu, γ -/ α -glukózu a jeden disacharid sacharózu. Identifikovali také organické sloučeniny jako byla kyselina *p*-kumarová (také *trans*-kumarová), aniont kyseliny jablečné, kyselina *trans*-skořicová, kyselina *trans*-/*cis*-kaffeiková, kyselina fumarová jeden alkaloid trigonellin a také jeden glykosid derivát sacharidu 1-O-ethyl- β -glykosid. Flavonoidy myricetin a *trans*-feruloyl derivát a fenolová neflavonoidní sloučenina kyselina *trans*-kaftarová.

Ve vinných listech byla obsažena nukleová báze adenin. Dále organická kyselina šikimová, kyselina askorbová, caffeoyl methyl ester kyseliny vinné a *cis*-feruloyl derivát. A po jednom cukerný alkohol inositol, flavonoid kvercetin, bioflavonoidní glykosid rutin a esenciální mastnou kyselinu α -linolenová.

Ve víně byly obsaženy aminokyseliny methionin, glutamát, aspartát, tyrosin, fenylalanin a aminoalkohol cholin. Organické sloučeniny 2,3-butandiol, ethanol, α -hydroxyisobutyryl, glycerol, laktát, ester kyseliny octové, pyruvát, citrát, aniont kyseliny jantarové, kyselina mravenčí, kyselina vanilková, kyselina syringová, tartrát, kyselina gallová (použitá k rozlišování vinných odrůd. (Gougeon, 2019)), 2-fenylethanol, kyselina *trans* – fertarová, kyselina *trans*-/*cis*-*p* – coutarová, kyselina ferulová, kyselina *cis*-kftarová a kyselina *trans*-kumarová. Derivát sacharidu kyselina β -D-glukuronová, monosacharidy β -glukóza, arabinóza, galaktóza, xylóza, rhamnóza, disacharidy sacharóza, trehalóza a turanóza. Flavonoidy kvercetin 3-O-glukosid, kaempferol, (+) - katechin, (-) - epikatechin a antioxidant *cis*-/*trans* – *resveratrol*. (Fotakis, 2013)

Vysoce aromatický alkohol fenethylalkohol, který je syntetizován kvasinkami, bakteriemi a houbami z L-fenylalaninu, a jehož obsah je závislý na alkoholovém kvašení a také na počátečním množství L-fenylalaninu v hroznech. Může být chemickým markerem odrůd. Vyšší obsah byl zaznamenán v Cabernet Sauvignon než ve víně Shiraz. U vín z oblasti

Bordeaux, je díky rozkladu vinných slupek v moštu, vyšší obsah methanolu, arabinózy a kyseliny galakturonové. (Gougeon, 2019)

3.3.1.2 Fermentace vína

Primární a sekundární sloučeniny jsou výsledky biologických reakcí, jako je ethanolové a jablečno – mléčné kvašení. Vlastnosti a koncentrace těchto metabolitů závisí na spoustě vlivů, jako je odrůda hroznů, typ kvasinek nebo bakterií způsobujících kvašení. Kontrolou těchto parametrů zajišťujeme získání jakostního vína. (López-Rituerto, 2012a) Během jablečno – mléčného kvašení dochází k přeměně kyseliny jablečné a citronové na kyselinu mléčnou, a to díky bakteriím mléčného kvašení. Je předpoklad, že jablečno – mléčné kvašení zvyšuje obsah některý látek ve víně, jako jsou aminokyseliny (fenylalanin, threonin, leucin, izoleucin, valin a ornitin), dále také nukleovou bázi uracil a v neposlední řadě kyselinu mléčnou. Naopak dochází k poklesu obsahu kyselin citronové a jablečné, glycerolu a některých monosacharidů. (Hong, 2011)

První přeměna hroznového moštu na víno, je způsobena primárním alkoholovým kvašením. Které je prováděno jedním nebo více kmeny kvasinek, nejčastěji rodem *Saccharomyces cerevisiae*. (Sumbly, 2014) Kvasinky přeměňují cukry na ethanol a oxid uhličitý. (Genisheva, 2013) Po primárním kvašení může nastat i sekundární jablečno – mléčné kvašení, v závislosti na vyráběném druhu vína. (Carr, 2008) Bakterie přeměňují kyselinu jablečnou na kyselinu mléčnou a oxid uhličitý. Sekundární kvašení je většinou spontánní a je to velmi zdoluhavý, pomalý a nepředvídatelný proces, u kterého není úspěch vždy zaručen. Nastává většinou u mladých vín během skladování, několik týdnů po ethanolovém kvašení. (Genisheva, 2013) Mezi indukovaným a samovolným jablečno – mléčným kvašením, byly pozorovány určité metabolické rozdíly, které způsobovali různou kvalitu vín. (Hong, 2011)

Jablečno – mléčné kvašení se provádí bakteriemi mléčného kvašení, nejčastěji *Oenococcus oeni* (Carr, 2008), která je acidofilní a zvládá nepříznivé prostředí vína. (Renouf, 2008) Pokusy prováděné s červeným vínem ukázaly, že kmeny rodu *Lactobacillus plantarum* mají potenciál vést jablečno – mléčné kvašení a vytvářejí žádoucí smyslové látky v červených vínech. Krom vlivu na kyselost umí Bakterie mléčného kvašení metabolizovat i jiné přítomné látky během kvašení, a proto dokážou měnit chemické složení vína. Tyto změny vedou ke zvýšenému obsahu vůně a chuti. (Sumbly, 2014)

Chemické složení a množství metabolitů vína je ovlivněno z největší části podnebím, půdou, vinařskými metoda, zvolenou odrůdou vinných hroznů a z velké části také technologií výroby samotného vína. (Hong, 2011) Nelze zapomenout na vliv genetiky. (Pereira, 2005) Všechny tyto aspekty se promítají do výsledné kvality. Aminokyselina prolin je v hroznech i víně, známá jako typický metabolit závislý na odrůdě révy vinné a klimatických podmínkách na vinici. S rostoucí expozicí slunečního svitu a s poklesem dešťových srážek klesá tvorba prolinu v hroznech. Hong et al. také zaznamenal výrazné rozdíly v obsahu prolinu u vína Cabernet Sauvignon vyrobeného v Austrálii, Kalifornii a Francii, čímž prokázal odlišné klima mezi srovnávanými oblastmi. (Hong, 2011) Oxid siričitý přidávaný do vína jako antioxidant je považován dle Sumbly za stresor, který potlačuje jablečno – mléčnou fermentaci. Krom antioxidantu je také využíván k potlačení mikrobiologické kontaminace při primárním

ethanolovém kvašení. Přítomnost tohoto stresoru ve víně může snížit činnost Bakterií mléčného kvašení a může pozastavit nebo zpomalit jablečno – mléčnou fermentaci. (Sumbly, 2014)

3.3.1.3 Vinařské evropské zóny

Víno z vinařských zón A a B musí mít nejméně 8,5 % objemových alkoholu. Z ostatních vinařských zón nejméně 9 % objemových alkoholu.

Do vinařské zóny A patří plocha německých vinic krom Bádenska, dále vinařské plochy Lucemburska, Belgie, Dánska, Irska, Polska, Švédska a v České republice oblast Čechy.

Do vinařské zóny B patří Německo s oblastí Bádensko, Francie s oblastmi Alsasko, Lotrinsko, Champagne, Jura, Savojsko atd., Rakousko, v České republice Morava, na Slovensku vše s výjimkou Tokajské vinohradnické oblasti, na Slovinsku vše mimo oblasti Brda nebo Goriška Brda, Vipavská dolina nebo Vipava, Kras a Slovenska Istra. Jedná se tak o oblasti Podravje a Posavje. Rumunská oblast Transylvánské plošiny. Chorvatsko se sub regiony Moslavina, Plešivica, Pokuplje atd.

Vinařská zóna C I zahrnuje ve Francii například viniční plochy v oblastech Allier, Gers, Tarn, Yonne. V okresech Valence, Tournon a kantonech Burzet, Coucouron a další. Italské viniční plochy v oblasti Valle d'Aosta a provinciích Bolzano, Trento, Belluno a Sondrio. Španělské provincie Asturias, Cantabria a další. Portugalská oblast „Vinho Verde“, která náleží regionu Norte. Dále všechny maďarské plochy.

Vinařská zóna C II zahrnuje francouzské oblasti Aude, Gard, Bouches-du-Rhône, část okresu Nyons, část kraje Var na jihu vymezený severní hranicí obcemi Evenos, Saint-Maxime, Cuers a další. V Itálii oblasti Lombardie (bez provincie Sondrio), Lazio, Campagna a další, a k těmto krajům patřící ostrovy Elba, Ponziene, Ischia a Capria. Španělské provincie Lugo, Ávila (krom obcí z pěstitelské oblasti Cebreiros), Álava, Huesca, Barcelona a severní část od řeky Ebro provincie Zaragoza, obce provincie Tarragona obsažených v označení původu Penedés a pěstitelská oblast Conca de Barberá. Slovinské oblasti Brda nebo Goriška Brda, Vipavská dolina nebo Vipava, Kras a Slovenska Istra. Bulharské oblasti Dunava ravnina, Černomořský rajón a Rozova dolina. Chorvatské sub regiony Hrvatska Istra, Hrvatsko, Primorje, Dalmatinska zagora, Severní, Střední a Jižní Dalmácie.

Do Vinařské zóny C III patří Řecko, Kypr, Malta, italské regiony jako je Calabrie, Sardinie a Sicílie a italské ostrovy Pelagijské, Egadské a Liparské. Francouzská část na Korsice. (č.1308/2013)

3.3.1.4 Významné vinařské státy v Evropě

3.3.1.4.1 Francie

Francie ve vinařském odvětví nemá ve světě žádnou konkurenci, a to z pohledu kvality vína a různorodosti svých druhů. Každý rok se ve Francii vyprodukuje průměrně 70 milionů hektolitrů vína. Z tohoto enormního množství vín, však víc jak polovina spadá do kategorie stolních vín „vin de table“, které nemohou nosit značení původu a kvalitu. Označení původu není vždy zárukou kvality. Některá vysoce klasifikovaná vína mohou svou kvalitou zklamat.

Francie jako první zavedla systém pro kontrolu kvality a původu vín, a proto založili v roce 1935 Národní institut pro označování původu (INAO).

Francouzská vína se dají klasifikovat do čtyř základních skupin. První z nich je Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) do které spadá 28 % z celkové produkce. Většina nejlepších francouzských vín spadá do této kategorie. Na etiketě musí být uveden původ vína, odrůda hroznů použitá pro výrobu, metoda pěstování a sběru hroznů, omezení výlisnosti a výnosu hroznů, použitá vinařská metoda a minimální obsah alkoholu. Na závěr kvalita produktu určená podle degustační stupnice.

Druhou skupinou je Vin Délimité de Qualité Supérieure (VDQS) do které patří 1,8 % celkové francouzské produkce. Vína této kategorie mají podobné nároky na kvalitu jako vína kategorie AOC. Vína této skupiny mohou být lehčí a není u nich vyžadován tak vysoký standard jako u vín kategorie AOC. některých případech je ale kvalita vín srovnatelná.

Do třetí skupiny spadají vína s označením Vin de Pays, kam patří 13 % z celkové produkce. Tato kategorie má za úkol rozlišovat kvalitativně horší vína. Označení Vin de Pays nesou vína proslulá jako „francouzská národní vína“. Průměrná roční produkce se blíží k 10 milionům hektolitřů. Dnes se tato skupina vín dělí do třech podskupin (pásmová, departementální a regionální podskupina). Každá podskupina je samostatně kontrolována. Na etiketě musí být označení původu, odrůda hroznů, zde je dovolena široká škála hroznů a výnos vinice, který může být vysoký. Výsledkem jsou vína různé kvality.

Poslední skupinou jsou stolní vína „Vin de Table“ do které spadá necelých 45 % francouzské produkce vína. Přepočtem na hektolitry se dostáváme na číslo 34 milionů hektolitřů vína, což dělá tuto skupinu největší. Tato levná vína jsou vhodná ke každodenní konzumaci a nehodí se ke skladování. Většina stolních vín vyprodukovaných na francouzském území se zde i spotřebuje. Na etiketě nesmí být uveden původ vína. Jeho obsah alkoholu a kvalita může být různá.

Zbylých necelých 13 % zařazených jako *vinus blancs de cognac* se používá k dalšímu zpracování v destilačním průmyslu. (Stevenson, 1999)

3.3.1.4.2 Itálie

Itálie svou produkcí vína zaujímá první příčku na světové úrovni. Ročně vyprodukuje 77 milionů hektolitřů vína, což představuje v evropském měřítku 33 % a ve světě 25 % celkové produkce vína. Pokles kvality vín byl způsoben zavedením zákona v roce 1963, který neumožňuje rozpoznat kvalitu vín. Byla zavedena legislativní úprava Denominazione di Origine (DOC), která je ekvivalentní k francouzskému AOC. Množství vín, které toto značení nese, rychle vzrostl a z kvalitních a známých značek vín, se stala časem vína slabá a nevhodná.

Na počátku sedmdesátých let se snížila spotřeba vína na území Itálie, což vedlo k většímu exportu. Jelikož se ale Italové nedokázali v kvalitě vyrovnat Francouzům, začali se soustředit na opačnou stranu trhu. Na trh přišli s dvoulitrovými láhvemi se závitovým uzávěrem, které ale nespĺňovaly představy DOC. Vinaři prodávali víno za velmi nízké ceny, jen aby se jejich vína více prodávala. Z toho na trhu vznikl problém, kdy vinaři produkovali velké množství nekvalitního vína, u kterého snižovali i jeho jakost. Výsledkem bylo znehodnocení označení DOC, kdy jsou ve stejné kategorii zařazena stolní vína, *Vina da Tavola*, a vína vysoké kvality. Stolní vína nemají odrůdová omezení. A tak se mnoho kvalitních vín, například na bázi Cabernetu smíchávají a prodávají se levněji jako stolní vína. (Stevenson, 1999)

3.3.1.4.3 Španělsko

Španělský vinařský průmysl je kombinací tradic a inovací a je také druhou nejvýznamnější zemí vyrábějící víno. V devadesátých letech dostala tato kombinace Španělsko do popředí v oblasti jemných vín. Španělská vína jsou ideální pro dobré znalce vín. Kolem roku 1970 se exportovalo téměř 95 % španělských vín a vyvážela se v tancích. Vína v cisternách byla nadměrně sířená oxidem siřičitým, čímž se Španělé pokoušeli zamezit oxidaci, která se v důsledku špatné úrovně výroby vína vyskytovala v nadměrném množství.

Většina španělských vín byla v tuto dobu nekvalitní. Bílá vína se z velké části vyráběla z podřadné odrůdy Airén, která se pěstovala po celé zemi převážně v nížinách. Za různými etiketami se ve směs ukrývala tatáž směsná vína. Lahvová vína bez úpravy nesla označení Chablis. Vína upravená vinným koncentrátem dostala název Graves, s vyšším obsahem koncentrátu se nazývají Entre-Deux-Mers a nakonec vína s velkým obsahem vinného koncentrátu nesou označení Barcas nebo Sauternes. Všechny tyto typy vína měly velmi vysoký obsah oxidu siřičitého a byly nevýrazné a fádni. Červená vína byla těžká, tmavá, oxidovaná a vystupoval z nich alkohol. Čím byly tyto kategorie výraznější, tím víc se blížily tehdejšímu francouzskému Burgundskému.

Export se po 70. letech začal snižovat a došlo ke snížení výroby nekvalitních podřadných vín. V dnešní době se dají španělská vína považovat za kvalitní a bezpečná. Velký úspěch zaznamenalo víno z oblasti Rioja a Španělé se v současnosti snaží přesvědčit zákazníky, že mají i jiné vinařské oblasti než právě Rioju. Své postavení si však udržuje i klasické Cherry. Za středisko výroby šumivých vín Cava je považováno Katalánsko. Mezi nejdražší a nejlepší španělské víno je považováno Vega Sicilia vyráběné v regionu Ribera de Duero, které od roku 1982 spadá pod chráněné označení původu „Denominación de Origen“ (DO). Toto označení je španělský ekvivalent k francouzskému AOC. (Stevenson, 1999)

3.3.1.4.4 Portugalsko

Není pro Portugalsko nic víc typičtějšího než jejich dolihovaná vína, portské a madeira. Dále se těší velké oblibě nenáročné bílé víno, vinho verde. Portugalsko patří do druhé poloviny první desítky největších zemí produkující víno na světě. Mohlo by se však umístit na lepší pozici, kdyby starší vinaři odstoupili od svého tradičního stylu vín. Tradičními víny se rozumí vína neušlechtilá a taninová, kdy mají vína velmi nízký hroznový charakter a vysoký stupeň oxidace. Do poloviny 70. let 20. století se Portugalci stejně jako Španělé snažili omluvit své nekvalitní víno tím, že používali výraz „tradiční hodnoty“. Až s nástupem nové generace vinařů a také tím, že Portugalsko v roce 1986 vstoupilo na Evropský společný trh, byl vymýcen problém starých vinařů se špatnou vinifikací.

Oblast Douro je domovem dolihovaného portského vína, na jehož výrobu je povoleno 48 odrůd, zahrnující krom modrých odrůd také bílé. Domovní oblastí Vinho verde jehož charakteristickými vlastnostmi je lehké, šumivé a vodově bílé zbarvení je oblast Minho. Vinho Verde se vyrábí z hroznů, které by neměly být úplně zralé. To dává vzniku vína, který má nízký obsah alkoholu (kolem 9 %), ale naopak má vysoký obsah kyselin. Kvůli udržení svěžesti se víno lahvuje velmi brzy a jablečno – mléčné kvašení probíhá v láhvi, následkem kvašení může mít víno různý stupeň šumění. Vyrábí se sice více červeného nežli bílého, ale ve skutečnosti jde všechno bílé víno na vývoz a často bývá doslazováno a dosyceno oxidem uhličitým.

Ostrov Madeira leží v Atlantickém oceánu přibližně 600 km západně od pobřeží Maroka a je domovem stejnojmenného alkoholického nápoje. (Stevenson, 1999)

3.3.1.4.5 Česká republika

Hrozny révy vinné se na území Čech a Moravy pěstují už od dob starověku, jak ukazují první písemné zmínky a archeologické nálezy z 9. století našeho letopočtu za doby Velkomoravské říše. V 11. až 13. století došlo k výsadbě dalších vinic a zavedla se první platná právní opatření. Tento krok vedl k rozšíření znalostí o vinařství mezi obyvateli, kteří s ním začali více obchodovat. (Svobodová, 2014) Ve 13. až 15. století se stalo víno vývozním zbožím. Karel IV. jevil o vinařství velký zájem, a tak dovezl do Čech několik odrůd révy vinné z Itálie a Francie. Kolem roku 1370 však vydal zákaz na dovážení vín do Čech. Výjimka platila pouze pro některá špičková vína. (Michlovský, 2017)

Vinařství a výroba vína v celé své historii podstoupila střídající se cykly hodů a posvícení s chudobou a hladomorem, které střídavě rostli a klesali (Svobodová, 2014). S tímto kolísáním byl spojen i přírůstek nebo úbytek vinic. (Michlovský, 2017) Toto kolísání bylo často spojeno se státní politikou, ekonomickou a sociální situací v Českých zemích. Všechny tyto aspekty ovlivňovaly každého farmáře i vinaře. (Svobodová, 2014)

20. století nebylo výjimkou pro pěstitele révy ani pro vinaře, kteří byli v Čechách i na Moravě ovlivňováni vnitřními a vnějšími vlivy, které na ně mají vliv dodnes. (Svobodová, 2014) K roku 2015 na území České republiky existovalo 18 216 pěstitelů vinné révy. Někteří provozují i vlastní vinařství, s celkovou výměrou vinic 17 688 ha z toho 94 % se nachází na území Jihomoravského kraje. Z celkové výměry českých vinic tvoří 58,5 % odrůdy bílých hroznů. (ČSU, 2015)

Tento trend, kdy má vinař vlastní vinici i vinařství je nejvíce zastoupen na Jižní Moravě. Na mnohých vesnicích je výroba vína neoddelitelnou součástí historie a kulturního života, což přispívá do místní ekonomiky. (Svobodová, 2014)

3.3.1.5 Chaptalizace

Chaptalizací se rozumí přidání cukru, které následně uměle vede ke zvýšení obsahu alkoholu u severoevropských vín. Ačkoliv je tento proces Evropskou unií povolen je v rozporu s definicí vína, kterou ukládá Evropská unie.

Nařízení Evropské unie povoluje přidavek cukru v letech, kdy jsou klimatické podmínky nepříznivé, bez jakéhokoliv povinného označení na etiketě. Chaptalizace však přeměňuje a degraduje vinařské a enologické postupy mnoha způsoby. Jeden způsob je zvýšená podpora na výnosnost plodin, bez jakéhokoliv zohlednění parametru kvality, jakým je přirozený obsah cukru. Druhý způsob je pěstování révy v oblastech, kde nemá vhodné podmínky pro růst, a to vede k zisku nekvalitních hroznů.

Ve středomořských zemích, jako je Španělsko, Itálie, Řecko a Portugalsko je zakázáno přidávat do vín cukr, naproti tomu na severoevropské státy takový zákaz neplatí a je to třetí způsob, jak se chaptalizovaná vína se mohou dostat na trh, aniž by přidaný cukr musel být označený na etiketě. Poslední způsob vede k nekalé soutěži, kdy jsou vysoce kvalitní vína nesoucí označení původu srovnávána s těmito podvodně upravenými víny, a jsou díky tomu znevýhodňována. Toto celé vede k dezinformaci spotřebitelů, kdy může způsobit zdravotní

riziko lidem trpící diabetem (možnost zbytkového cukru ve víně). Mimo jiné také zpochybňuje regionální označení původu. (Parga-Dans, 2017)

3.3.1.6 NMR analýza vína

Nukleární magnetická rezonance si dokázala vybudovat důležité postavení pro charakterizaci a kontrolu potravinové kvality. Její využití je lepší pro kvalitativní nežli kvantitativní stanovení složek v dané potravíně. V roce 2008 Viggiani et al. se pustili do první studie italských vín pocházející z regionu Basilicata na jihu Itálie. Odkud pochází červené víno Aglianico del Vulture nesoucí CHZO. Cílem jejich práce bylo porovnat červené víno z regionu Basilicata (pocházející ze čtyř vinic s různým podložím) se stejnou odrůdou Aglianico z regionu Kampánia, taktéž z jihu Itálie. Jako primární diskriminační faktor se rozhodli použít kyselinu jantarovou, která nemá nic společného s ročníkem vína. Dále se ztotožnili se skutečností, že jako marker pro určení zeměpisného původu je aminokyselina prolin. (Viggiani, 2008)

Lee et al., který testoval dva ročníky (2006, 2007) vín Meor (*Vitis coignetiae*) došel k závěru, že hladiny prolinu a polyfenolů obsažených ve víně nemají žádnou spojitost s použitým kmenem kvasinek. Obsah těchto dvou látek závisí na ročníku sklizně, který je ovlivňován z největší části sluneční expozicí a množstvím srážek během vegetačního období, dále je také vliv teploty a relativní vlhkosti. V této studii je kladen důraz na spojitost mezi vícerozměrnými statistickými údaji o globálních metabolitech vín a mezi meteorologickými údaji na vinicích, které poskytují přesnější charakterizaci vinných hroznů nebo vína. (Lee, 2009)

Necílená ^1H NMR analýza patří mezi nejnovější postupy používané při autentizaci vína. Tato metoda využívá celý otisk spektra a poskytuje vícerozměrné porovnání s databází autentických vzorků vín. Tuto metodu zpopularizovala firma Bruker jako „Wine Screener“. Citlivost této metody se v posledním desetiletí výrazně zlepšila, a to díky pokroku v technologii spektrometrů a tlumících rozpouštědel. Které v současnosti umožňují v alkoholických nápojích stanovit vedlejší sloučeniny ve velmi nízkých koncentracích, a to až v nízkých koncentracích ppm (parts per milion). (Lachenmeier, 2016)

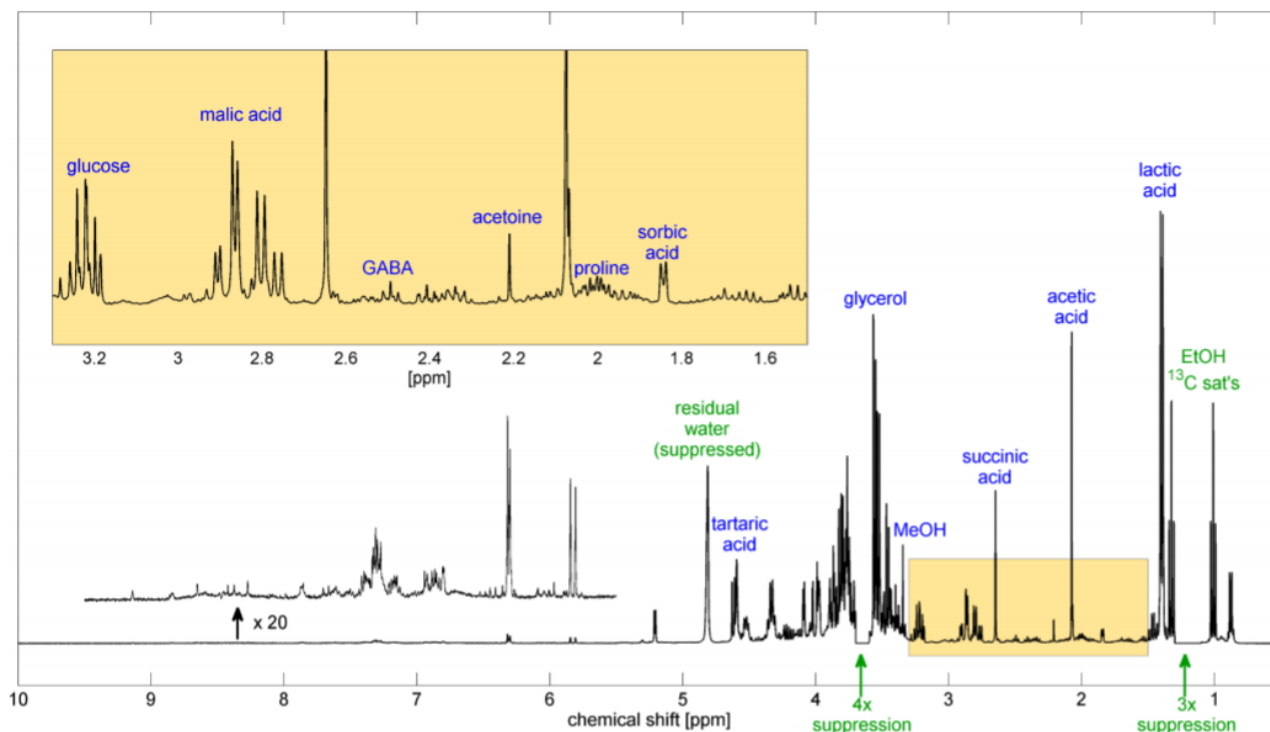
K porovnávání vín slouží metoda Wine – Profiling TM. Tato metoda porovnává spektroskopické fingerprinty získané od jednotlivých vzorků s velkou databází autentických vzorků vín. Díky tomuto lze odpovědět na otázku, jaký je zeměpisný původ a složení vína. Dále také můžeme poznat odrůdu bobulí a ročník. Ačkoliv byla tato metoda původně vyvinuta pro analýzu ovocných šťáv, časem došlo k její úpravě a dnes ji také můžeme využívat k rozborům vína a alkoholických nápojů. (Minoja, 2014) Analytické metody vhodné pro testování pravosti vína musí být schopny rozlišovat odrůdy révy, zeměpisný původ, a i jeho ročník. (López-Rituerto, 2009)

Zjištění zeměpisného původu vína je hlavní otázkou autentizace vína. (Lachenmeier, 2016) Cílená analýza NMR s vysokým rozlišením byla užitečná pro určení některých specifických markerů odrůd révy vinné, nebo technologického postupu výroby vína. Jako marker zralosti se podle četnosti výskytu zdá aminokyselina prolin. (López-Rituerto, 2009) Prolin je jednou z nejvíce zastoupených aminokyselin ve vinných hroznech a následně i ve víně.

Jeho obsah koreluje s odrůdou hroznů. Odrůda Cabernet Sauvignon a Merlot, které jsou hlavní odrůdou francouzského regionu Bordeaux jsou na prolin bohaté. (Gougeon, 2019)

Prolin by mohl být využíván jako marker indikující klimatické podmínky při zrání hroznů a poté i u vína, kde je prolin nevyužitelný jako zdroj dusíku vinařskými kvasinkami a bakteriemi. Mimo jiné byla pomocí NMR a MS zaznamenána pozitivní korelace mezi obsahem prolinu a chutí v ústech při sensorickém hodnocení. (Hong, 2011)

V roce 2019 byla provedena studie, kdy bylo pomocí kvantitativní NMR (qNMR) v kombinaci s vícerozměrnou statistickou metodou analyzováno 224 vzorků komerčních červených francouzských vín z různých terroir (127 vzorků pocházelo z oblasti Bordeaux, 97 pocházelo z ostatních vinařských oblastí). Analyzovaná vína pocházela z regionů Bordeaux, která byla srovnávána s víny z oblastí Beaujolais, Burgundsko, Côtes du Rhône, Languedoc – Roussillon a údolí řeky Loire. Všechny tyto oblasti nesou CHOP. Testovaná vína pocházela z ročníků 2004 až 2017. Pomocí qNMR došlo k rozpoznání vín z Bordeaux od ostatních francouzských vín s CHOP, ale také došlo k jeho určení. Kdy byla vína z Bordeaux určena s přesností na 95 %, čímž se prokázala specifčnost vín z této oblasti oproti jiným vínům. Mimo jiné se zabývali sledováním účinků vývoje vína během zrání v lahvi a ročníku lahvování. Jejich výzkum mimo jiné potvrdil, že Cabernet Sauvignon obsahuje velké množství kyseliny gallové. (Gougeon, 2019) Na obrázku číslo 2 je vidět spektrum vína s rozpoznáním daných sloučenin, bylo také využito simultánního nasycení vody a ethanolu (sekvence Bruker Pulse NOESYCPSS1D kombinovaný s osminásobným potlačením aplikací příslušného tvarového pulsu). Před samotnou analýzou došlo v osmi sekvencích k potlačení hlavních složek – vody a ethanolu. (Godelmann, 2013).



Obrázek 2. NMR spektrum vína (přejato z Godelmann, 2013)

Existuje také silný důkaz, kdy metabolický otisk vína odráží složení vína, kterým lze určit odrůdu, ročník a podloží půdy. Fenolové sloučeniny ve víně jsou zodpovědné nejen za

senzorické vlastnosti jako je barva, svíravost a trpkost, ale jsou také antikarcinogenní, antivirové a mají pozitivní účinek na kardiovaskulární systém. Polyfenoly, které byly vyextrahovány z vína a prošly NMR analýzou jsou dobrým ukazatelem pro určení odrůdy, ročníku a zeměpisného původu. Množství sekundárně vzniklých fenolových metabolitů v hroznech a poté i ve víně, je ovlivněno řadou faktorů. Mezi hlavní vlivy patří odrůda révy vinné, půda, podnebí, agronomické postupy vinaře, množství světelného záření, stádium zralosti i případná infekce hroznů. (Anastasiadi, 2009)

Krom geografického původu lze pomocí ^1H NMR předpovídat i odrůdu vinných hroznů. Při testování německých vín byly správně rozpoznány odrůdy Müller-Thurgau, Ryzlink rýnský, Rulandské modré a Tramín kořenný z více než 600 vzorků odrůd vín, s přesností na 95 %. Jako každá jiná metoda, má i tato své nevýhody. K určení přesnosti je potřeba rozsáhlá databáze vzorků vín z každého ročníku a z každé vinařské oblasti. (Lachenmeier, 2016)

Tabulka 1. Systematický přehled vědeckých studií zaměřených na NMR analýzy vína

Autor	Počet vzorků	Vino	Příprava před analýzou	NMR	pH	Statistická analýza dat	Kvantifikace	Výsledky
(Viggiani, 2008)	20	Aglianico del Vulture	1) Přímá analýza 2) Metoda zkoncentrování vzorku (zmraženo, lyofilizováno)	Varian 400, vybaven 5 mm sondou s přímou detekcí pulzního pole s gradienty osy z. Pro ^1H 399,96 MHz a pro ^{13}C 100,57 MHz, využití presaturace H_2O , doba akvizice 1,9 s, relaxační zpoždění 5 s	Přirozené, během analýzy pokles na 2,5-3,2	PCA	alanin, isoleucin, leucin, prolin, k. mléčná, k. jantarová, glycerol, (2,3-butanediol), sacharóza, α -D-glukóza	U neupravených vzorků, docházelo v alifatické oblasti k překrývání menších sloučenin (aminokyseliny, sacharidy) hojně zastoupeným ethanolom a glycerolem – vody byla presaturovaná. U lyofilizovaných vzorků byla odstraněna většina vody a ethanolu a spektra byla lépe čitelná. Minoritní sloučeniny – aminokyseliny, alkoholy, fenolové sloučeniny analyzovány ^1H a ^{13}C NMR s využitím technik 1D a 2D NMR. Mezi víny byly pozorovány rozdíly podle ročníku a zeměpisného původu.
(Pereira, 2005)	134	Merlot Noir, Cabernet Franc, Cabernet – Sauvignon (oblast Bordeaux)	1) slupky namlety a extrahovány 2) dužina extrahována, sušení ve vakuu, rozpuštění v oxalatovém pufru a sušení ve vakuu, rozpuštění v D_2O , úprava pH, lyofilizace	Avance, 300 K na 500MHz pomocí 5 mm inverzní sondy, opatřený automatickým vzorkovačem. akviziční čas 2,73 s, relaxační zpoždění 25 s /sken	4	PCA	19 sloučenin bylo identifikováno jak ve slupce, tak v dužině – isoleucin, leucin, valin, threonin, alanin, arginin, prolin, glutamin, GABA, glukóza (α , β), sacharóza, fruktóza, k. jablečná, k. mravenčí, k. fumarová, k. mléčná, k. citronová, k. jantarová, k. vinná	Byly porovnávány 4 skupiny vzorků vín z Bordeaux, také se porovnával obsah látek ve slupkách a v dužině. Byl pozorován vliv terroir na metabolický profil dužiny i slupky. Pomocí PCA bylo identifikováno 19 sloučenin, které umožnili pozorovat rozdíly mezi jednotlivými spektry. Největší zastoupení měla u slupek fruktóza, glukóza a u dužiny to byla fruktóza, glukóza, malát a prolin. K. mléčná byla významnou proměnou ve vzorcích ze slupek. ^1H NMR spektrometrie ethanolových extraktů zředěných D_2O neumožnila identifikaci fenolových sloučenin kvůli překrývajícím se rezonancím signálu a složitosti jejich spektra.

Autor	Počet vzorků	Vino	Příprava před analýzou	NMR	pH	Statistická analýza dat	Kvantifikace	Výsledky
(Gougeon, 2019)	204	Cabernet Sauvignon, Merlot	odstředění vína	Bruker BioSpin 600MHz, teplota 293 K, čas relaxace 5 s a doba vzorkování 2,726 s.	3,1	PCA, OSC-PLS-DA	2,3-butandiol, k. octová, acetoin, alanin, látky obsahující alkohol, arginin, k. kávová, katechin, cholin, k. citronová, epikatechin, ethanal, athyl acetát, athyl laktát, fruktóza, k. fumarová, k. gallová, k. galakturonová, k. GABA, glukóza, glycerol, isobutanol, isopentanol, k. mléčná, k.jablečná, manitol, methanol, myo-inositol, fenethyl alkohol, prolin, k. pyruová, k. shikimová, k. sukcinová, k. syringová, k. vinná, treonin, trigonelin, tyrosin, valin, xylóza	Správnost určení vín z Bordeaux je 95 %. Vína z Bordeaux obsahují oproti ostatním francouzským vínům více prolinu, fenethyl alkoholu, k. jantarové, k. gallové, arabinózy, k. galakturonové, methanolu a isopentanolu. Oproti tomu mají méně k. mléčné, k. kávové, ethyl laktátu, a 2,3-butandiolu.

Autor	Počet vzorků	Víno	Příprava před analýzou	NMR	pH	Statistická analýza dat	Kvantifikace	Výsledky
(Son, 2008)	28	Cabernet Sauvignon, Shiraz, Campbell Early	Vína lyofilizována a následně rozpuštěna a poté odstředěna.	Spektrometr Varian VnmrS 600, pracující při 599,84 MHz, teplotě 298 K, nepřímá detekční sonda s trojím rezonančním odporem 5 mm, pulsní sekvence noesyprsat k potlačení zbytkové H ₂ O, čas relaxace 1,5 s, akviziční čas 4,00 s.	4	PCA, PLS-DA	valin, 2,3-butandiol, ethanol, k. mléčná, alanin, prolin, k. octová, k. jablečná, k. citrónová, k. jantarová, glycerol, k. vinná, glukóza (α , β), k. gallová, 2-PE	K porovnávání kontinentálních Cabernet Sauvignon z Francie, Kalifornie a Austrálie byly vypočteny modely PLS-DA. V ¹ H NMR spektrech bylo identifikováno 16 metabolitů. K. jablečná byla identifikována pouze u korejského vína Campbell Early, protože tato vína nebyla fermentována ML bakteriemi, které přeměňují k. jablečnou na k. mléčnou. Krom zbytkového ethanolu během lyofilizace nebyla hladina k. octové ve všech vzorcích konstantní z důvodu neúplné lyofilizace, což byl hlavní problém v reprodukovatelnosti. Obsah 2,3-butandiolu a k. octové byl stejný před i po lyofilizaci.
(López-Rituerto, 2012b)	111	Rioja	Vzorky uchovávány při -25 °C. Po rozmrznutí, upraveno pH, odstředěno	Bruker Avance III 600, pracující při 600,13 MHz pro ¹ H, vybavený dvojitou vyladěnou kryoprobou (TCI) připravenou pro 5 mm zkumavku, relaxační zpoždění 10 s.	3	PCA	ethanal, histidin, k. mravenčí, resveratrol, 2-fenylethanol, tyrosin, k. gallová, k. fumarová, k. vinná, glukóza (α , β), fruktóza (α , β), ethanol, methanol, GABA, k. citronová, k. jablečná, k. sukcinová, glutamin, k. glutamová, prolin, valin, k. octová, arginin, alanin, k. mléčná, 2,3-butanediol, leucin, isobutanol, isopentanol, 1-propanol	Došlo k rozpoznání vinného moštu a vína po ukončení alkoholového kvašení. Během MLF se sledovala přeměna k. jablečné na k. mléčnou, kontrola tohoto procesu je nutná – odráží kvalitu výsledného vína. Rozdíl ve spektrech moštu a vín byla přeměna sacharidů v moštu, na alkoholové a organické sloučeniny ve víně. Obsah aromatických sloučenin zůstal neměnný jak v moštu, tak i vínu. Sacharidy z moštu však nezmizely, ale zanechaly složitý fingerprint specifický pro jednotlivé vzorky.

Autor	Počet vzorků	Víno	Příprava před analýzou	NMR	pH	Statistická analýza dat	Kvantifikace	Výsledky
(Nilsson, 2004)	3	portské víno	přidaná D ₂ O a pro referenční chemický posun TSP	Bruker Avance DRX-500 pracují při 500 MHz pro ¹ H, spektra získána pomocí pulzní sekvence NOESYPR1DSP, akviziční čas 1,36 s, relaxační zpoždění 4,0 s, potlačení H ₂ O a Et-OH	Port A (pH=3,43), Port B (pH=3,70), Port C (pH=3,66)	N/A	Port A má v alifatické oblasti nižší obsah k. jantarové, k. pyruvové, GABA a prolinu, ale má vyšší obsah k. mléčné a acetátů.	Identifikovány hlavní složky, v alifatické oblasti NMR spektra k. octová/acetáty, k. jantarová, k. pyrohroznová, k. mléčná a alkoholy se středním řetězcem (1-propanol,2-methyl-1-propanol) spolu s malým množstvím aminokyselin. Důležitým ukazatelem je k. octová, která byla nejvyšší u Port A (570 mg/l), poté u Port B (220 mg/l) a nejnižší u Port A (170 mg/l). Je zřejmé, že všechna vína obsahují podobné koncentrace alkoholů se středním řetězcem.
(Godelmann, 2013)	583	Ryzlink rýnský, Pinot noir, Muller-Thurgau, Rulandské bílé, Rulandské šedé, Dornfelder Gewürztraminer, Silvanské, Lemberger	upraveno pH	Bruker BioSpin Avance III vybaveným 5 mm ¹ H/D-TXI sondou se z-gradientem, automatickým laděním a odpovídajícím doplňkem a BTO-2000 pro regulaci teploty, měřeno při 300,0 K, NOESYGPPS	3,10 (± 0,02)	PCA, LDA, MANOVA	methanol, k. mléčná, k. citrónová, k. jablečná, k. jantarová, k. octová, k. fumarová, k. vinná, 3-methylbutandiol, aceton, alanin, k. shikimová, k.kftarová, 2,3-butandiol, glycerol a ethanol.	Nízký obsah k. shikimové ve vínech, zejména u Burgundských vín, umožňují predikci odrůdy hroznů. Hladina k.kftarové je primárním ukazatelem pro odhad úrovní oxidace, které víno podstoupilo. Červená vína vykazují vysokou hladinu k. kftarové, která je výsledkem kvasných procesů, zatímco bílá vína mají velmi nízkou hladinu k. kftarové. Proto je obsah k. kftarové primárně výsledkem technologie vína a nesouvisí s odrůdou hroznů. Také hlavní produkt kvašení – ethanol a vedlejší produkt glycerol jsou u vín z různých odrůd hroznů v podobném rozmezí a nelze je považovat za diskriminační faktory pro odrůdy révy.

3.3.1.7 Falšování vína

V 19. století se používali pro rozjasnění barvy hlinité soli a pro zvýraznění fialové barvy červených vín se využívaly extrakty z bobulovin. Zrání v sudech bylo simulováno dubovými pilinami, které byly předchůdkyně současné legální techniky přidávání dubového dřeva. Větší riziko však představovalo přidávání olovnatých solí pro vyčeření a slazení. (Lachenmeier, 2016) Chaptalizace, patřila v 19. století mezi nejčastější praktiky falšování vína na území Francie.

V posledních letech se však zlepšily metody a způsoby falšování, jelikož metody analytické chemie dokázaly odhalit i těžce rozpoznatelné látky použité k falšování. (Lachenmeier, 2016) Tabulka číslo 2 sumarizuje nejčastější praktiky falšování vína. Holmberg et al. uvádí, že v roce 2010 bylo na evropském trhu přibližně 10 % vín z celkové produkce, která měla nižší kvalitu, než byla uvedena na etiketě. Bohužel, však většina běžných spotřebitelů tento fakt nedokázala rozpoznat, protože jej ani odborníci na víno nedokázali organolepticky odhalit. (Holmberg, 2010) Falšování vína bývá nejčastěji prováděno díky přidavku látek, které ovlivňují kvalitu. Nejčastěji to jsou látky, které kvalitu snižují, pozměňují nutriční složení, a tak nedodržují právní předpisy a je u nich výskyt zdravotních rizik. (Alañón, 2015)

Určení geografického původu je jednou z hlavních otázek při určování pravosti vína. K tomuto účelu bylo navrženo několik metod. Které na základě dat z vícerozměrných analýz instrumentálních metod, porovnávají neznámé vzorky se souborem autentických vzorků. Mezi nejběžnější metody určování autentizace vín patří metody založené na poměrech stabilních izotopů. (Lachenmeier, 2016)

Mezinárodní organizace pro révu a víno (OIV) publikovala ve svém souhrnu několik mezinárodních metod pro analýzy vína a vinných moštů. Jednou z nich je využití specifické metody nukleární magnetické rezonance (SNIF-NMR) sledující distribuci přírodní izotopové frakcionace v různých místech v molekule, pro stanovení distribuce deuteria v ethanolu, jakož to i jeho izotopového poměru $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ vody, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ethanolu a $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ glycerolu. Z velké části byla určena regionální pravost právě pomocí izotopového poměru. Bylo tak rozlišeno velké množství italských a španělských vín z různých regionů. Bylo možné detekovat přidaný čtyřuhlíkatý rostlinný cukr. Také došlo k odhalení chaptalizace a určení ročníku a zeměpisného původu slovinských vín. Evropská unie sestavila databázi vín, která obsahuje izotopové poměry pravých vín ze všech regionů, které lze použít při srovnávání vín v případě podezření na falšování. (Lachenmeier, 2016) Z cílené a necílené NMR spektroskopie se stala první rutině používaná metoda v oblasti alkoholických nápojů. (Godelmann, 2013) Velkým přínosem by bylo zřízení databáze s autentickými vzorky nápojů, které by byly podobné databázím s izotopovými poměry vín na území EU. Z technologického hlediska byl zaveden přísnější systém kontroly HACCP, aby se dalo zabránit falšování vína. Ve skutečnosti by to odhalilo jen hrubé formy falšování, např. Methanol. (Lachenmeier, 2016)

Ve vinařství je nejčastějšími typy falšování nepovolené přidávání přírodních či syntetických sladidel, přídavek ethanolu, ředění vodou a přidávání umělých látek k zakrytí různých vad vína. (Hong, 2017) Další zakázanou praktikou je míchání různých odrůd vinných moštů anebo také míchání jedné odrůdy za získáním vyšší kvality. Přídavek levnější odrůdy,

než je uvedena na etiketě je podvod zákazníka. Důvod proč takto vinaři víno falšují je požadavek na lepší senzorické vlastnosti. (Alañón, 2015)

Tabulka 2. Typy falšování vína (převzato z Lachenmeier, 2016)

Typ	Popis	Rizika pro spotřebitele
Nesprávné označení původu, zařazení do jakostní skupiny, rok sklizně	Nejčastější typ falšování vína. Často je usnadněn maloobchodními řetězci, kdy je prezentováno "kvalitní" víno za nízkou cenu.	Nepřináší žádné zdravotní riziko pro spotřebitele. Zákazník je pouze klamán a platí za levné víno, které je prodáváno jako víno vyšší kvality.
Falšované víno	V současné době se vyskytuje jen ojediněle. "Vino" se skládá pouze z vody a aditiv.	Aditiva, která byla použita pro výrobu tohoto nápoje a která nebyla uvedena na etiketě můžou způsobit konzumentovi alergickou reakci.
Zlepšení vína	Při zlepšování vína se využívá cukr, glycerol, diethylenglykol či jiná sladidla. Dále se také přidávají aromatické sloučeniny pro zlepšení vůně. Další praktikou může být smíchání sladších nebo cizích odrůd vína.	V tomto případě je zákazník pouze klamán a podváděn. Ohrožení zdraví není na místě, výjimku nastává jen v případě, kdy výrobce přidá toxickou látkou, jakou může být například methanol.

3.5 Pivo

Pivo má více než staletou historii, je součástí naší přítomnosti a bude zajisté i součástí budoucnosti. Účinné látky v pivu mají pozitivní vliv na náš imunitní systém, snižují tvorbu rakovinotvorných buněk, chrání před kornatěním tepen, a dokonce i prodlužují život. (Marova, 2011) Pivo je definováno jako fermentovaný nápoj vyrobený z vody, sladového ječmene, chmele a pivovarských kvasinek. Slad je bohatým zdrojem škrobu. Škrob, je později přeměněn pivovarskými kvasinkami na jednodušší látky. Typické aroma a hořkou chuť získává pivo díky chmelu. (Marova, 2011) (Rodrigues, 2011b) Pro vylepšení nebo pro ozvláštňení chuti lze využít i ovoce, bylinky, případně různé druhy koření. (Duarte, 2002)

I přes vývoj moderních technologií a zařízení, zůstaly tradiční postupy nezměněny. Pivovarský průmysl je rozšířen po celém světě a skládá se primárně z několika nadnárodních společností a z několika tisícovek menších výrobců. Mezi tradiční evropské pivovarské země s vlastními typy piva patří Německo, Belgie, Velká Británie, Irsko, Polsko, Česká republika, Skandinávie, Nizozemsko a Rakousko. Přes mezinárodní variace je pivo rozděleno dle způsobu kvašení, na piva svrchně a spodně kvašená. (Marova, 2011)

Celosvětově existuje nespočet kombinací, přísad a procesů vaření piva, které dávají vzniknout tomuto kvašenému nápoji. (Rodrigues, 2011b) Piva z různých regionů a pivovarů se od sebe liší i přes dodržování stejných technologických postupů. Sládci pro výrobu piva z velké části využívají lokální suroviny. Když bychom chtěli jednotlivá piva porovnávat, museli by všechny pivovary uvařit pivo podle stejné receptury a posuzovalo by se jen jeho dodržení a výrobní postup. (Mosher, 2017)

Vztah těchto sensorických vlastností k chemickému složení piva není zcela znám. Tato skutečnost, zabraňuje úplné a dobře zhodnotitelné chemické/ biochemické analýze, která by vedla k bližší specifikaci vlastností piva. (Almeida, 2006) Obsah alkoholu je jedním z prvních sensorických parametrů, který je hodnocen spotřebiteli, ale také sládkem při přípravě receptury. Koncentrace alkoholu v pivu může být od 0,1 do 12 % a více. Když je obsah alkoholu vysoký, konzument cítí teplo v ústech a žaludku. (Mosher, 2017) Analytickými metodami se měří hořkost a barva, enzymatickými analýzami se stanovují organické kyseliny a plynovou chromatografií se detekují vyšší alkoholy. (Rodrigues, 2011b)

3.5.1 České pivo

České pivo je výjimečné, tím že se vaří jedinečným postupem v určité zeměpisné poloze. Evropská unie v říjnu roku 2008, dovolila České republice používat ochranou známku „České pivo“. (Marova, 2011) V České republice je pivo považováno za národní nápoj a součást kulturního dědictví. Od ostatních piv se české pivo odlišuje specifickými sensorickými vlastnostmi, které jsou dány specifickou výrobní technologií a využitím jedinečných lokálních surovin. Nejslavnějším českým pivem je pivo plzeňského typu, které získalo své důležité postavení na celosvětovém trhu. Chráněné zeměpisné označení „České pivo“ nesmí používat všechny pivovary vařící pivo na území České republiky, ale pouze jen ty pivovary dodržující postup a suroviny uvedené v žádosti psané Evropské unii. Bylo zjištěno, že České pivo obsahuje odlišné spektrum polyfenolů, tékavých sloučenin a profilů aminokyselin. (Olšovská, 2014)

3.5.2 Chemické složení piva

Pivo je po chemické stránce, velmi složitý produkt, ve kterém je nejvíce zastoupena voda, ethanol a kombinace různých sacharidů. Kvalita tohoto fermentovaného nápoje se hodnotí sensoricky, a to na základě organoleptických charakteristik, mezi které patří barva, chuť, celkový vzhled a aroma. (Rodrigues, 2011b) Studium chemického složení piva je velmi významné jak pro hodnocení kvality piva, tak pro vývoj nových produktů. Obsah sacharidů, převážně zkvasitelných jako je glukóza, maltóza, maltotrióza, různé dextriny a arabinoxylany jsou závislé na typu vařeného piva. Je tedy rozdíl mezi pivy spodně a svrchně kvašenými. Tyto sloučeniny mají vliv na chuť, které vnímáme v ústech. Těmito chutěmi je chuť sladká, kyselá a hořká. Za chuť piva jsou mimo jiné zodpovědné fenolové sloučeniny, mezi které patří kyselina skořicová, kyselina benzoová, dále katechiny a flavonoly.

Bílkoviny a aminokyseliny ovlivňují stabilitu pěny a množství zákalů v pivu. V zanedbatelném množství byly v pivu nalezeny mastné kyseliny se středním řetězcem, vitamíny, těkavé látky, hořké kyseliny a biogenní aminy. Nejčastěji zastoupené sloučeniny jsou acetaldehyd (i hydratovaná forma), kyselina octová (i acetáty), adenosin, inosin, alanin, kyselina citronová, cytosin, ethyl ester, kyselina mravenčí, GABA, kyselina gallová, histidin, isobutanol, isopentanol, kyselina mléčná, kyselina jablečná, prolin, propanol, kyselina prydrohroznová, kyselina jantarová, tryptofan, tyrosin, uridin, zkvasitelné cukry, lipidy a polyfenoly. (Duarte, 2002)

3.5.3 Druhy piv

3.5.3.1 Piva spodně kvašená

Pro kategorii piv spodního kvašení je typické použití kvasinek *Saccharomyces pastoranus*, které podle historických pramenů v zimních měsících klesly na dno kvasných kádí a tím získaly větší šanci na přežití. Proto spodně kvašená piva kvasí při nízkých teplotách. V Evropě pochází převážná část ležáků z pivních velmocí, kterými jsou Německo, Francie a Česká republika. Anglické ležáky jsou dnes jedněmi z nejžádanějších piv na trhu. Nejspíš kvůli nižšímu obsahu alkoholu, svěží a čisté chuti, která vzniká díky přidavku rýže. U amerických ležáků se také využívá přidavku rýže nebo v některých případech kukuřice. Tyto příměsi dávají pivu jemnou chuť a světlejší barvu. Co se týče obsahu alkoholu ten je nižší, čímž se snaží přiblížit chuti pšeničného piva. Důležitým charakteristickým znakem je vysoká nasycenost oxidem uhličitým.

Na počátku 40. let 19. století vznikl v Plzni typ piva, pro který je charakteristický dekokční způsob rmutování. Plzeňský ležák má zlatou barvu, výrazné aroma a lehce hořkou chuť. Tomuto ležáku je dosti podobný vídeňský ležák, který je velmi populární v Německu na pivním festivalu Oktoberfest. Má tmavší barvu, výraznou chuť po praženém sladu a má také vyšší obsah než Plzeň.

Ležácké pivo typu Bock jehož hlavním rysem je sladší, lehce chmelená chuť a vyšší obsah alkoholu (kolem 6,5 % objemových). Bock zahrnuje několik podtypů, přičemž nejznámější jsou dva. Prvním je pivo Doppelbock, který je stejně chmelený jako Bock, ale má vyšší obsah alkoholu. Poprvé toto pivo uvařil řád Paulánů v Mnichově. Druhým podtypem je specialita severního Bavorska pivo Eisbock, který je unikátní částečným zmražením Bocku. Ze kterého

se takto odstraní přebytečná voda a pivo dostane silnější chuť a zvýší se obsah alkoholu. Při opakovaném mrznoucím procesu se lze dostat až na 30 % objemových alkoholu. (Mosher, 2017)

3.5.3.2 Piva svrchně kvašená

Svrchně kvašená piva neboli piva typu Ale, využívají rod kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které zkvašují mladinu na povrchu za vyšších teplot. Piva typu Ale nemají svěží a čistou chuť jako ležáky, ale je pro ně spíš typická chuť ovoce a koření, která po napití v ústech dlouho přetrvává. Svrchně kvašená piva se dělí do tří podskupin podle místa výroby, a to na první podskupinu Evropskou, druhá podskupina zahrnuje Anglii, Skotsko a Irsko a poslední podskupina patří Americe.

Evropská podskupina piv typu Ale z největší části zahrnuje piva belgická, německá a francouzská. Německá pšeničná piva jsou kalná, z důvodu vysokého obsahu pšeničných bílkovin. Pšenice v tomto druhu piv musí zaujímat minimálně padesát procent z celkového množství obilnin. Pro piva francouzská a belgická, je typická bohatá a těžká ale celkově vyvážená chuť.

Do německé podskupiny patří piva typu Sour Ale, pro které je typická kyselá chuť. Kyselá chuť těchto piv je způsobena díky divokým kvasinkám rodu *Lactobacillus* (případně *Bettanomyces*), které produkují kyselinu mléčnou. Obsah alkoholu pro tento typ není přesně vymezen.

Belgická podskupina piv, je charakteristická vyšším obsahem alkoholu, který je od 6 do 12 % objemových. Belgický Ale může na konzumenta působit stejným dojmem jako víno, a to díky chuti a aroma, které je způsobeno přidáním sušeného ovoce, například švestek či rozinek. Piva z Anglie, Skotska a Irska si jsou svými vlastnostmi velmi podobné.

Anglický Ale je rozmanitý a patří sem ječné víno, pivo Imperial Stout, ale také typ Robust Porter. V dobách, kdy patřila Indie k britským koloniím, bylo potřeba aby pivo přežilo dlouhý transport na lodích. Proto se Britové uchýlili vyššímu přídatku chmele a také zvýšili obsah alkoholu, což vedlo k prodloužení doby skladování. A jelikož toto pivo mělo v důsledku použití světlého sladu světlou barvu a vyváželo se do Indie, vznikl styl piva nesoucí název India Pale Ale (IPA). Dalším zajímavým stylem piva, který původně vznikl jako nápoj k uhašení žízně dělníků v loděnicích nese název Porter. Dříve se pro přípravu tohoto piva využíval slad pražený nad ohněm, a dával tak pivu tmavou barvu, kouřovou chuť a aroma. S příchodem průmyslové revoluce nastala změna při vaření tohoto piva, která se udržela až do dnešní doby. Dnes se při přípravě Porteru využívá čokoládový slad a pražený ječmen. Díky tomu je pro toto pivo charakteristická tmavě hnědá až černá barva, silná příchut' sladu, ale objevuje se také chuť karamelu, kávy, případně čokolády. Nejtypičtějším zástupce Skotského piva typu Ale je Stout, pod který patří nejvíce uznávané pivo Guinness. Charakteristicky chmelovou chuť získává toto pivo díky přídatku chmele již na začátku výroby.

Poslední skupinou piv typu Ale jsou piva americká. Převážná část piv uvařená na území Ameriky nepřichází s žádným novým způsobem vaření piva a čerpá tak z evropských receptur. Kdy recepturu dodržují, nebo vytváří kombinaci evropských stylů. Nejčastěji se Američané pouští do anglického piva typu IPA. Americká verze Porteru je často obohacována o extrakty ze studené kávy či kakaových bobů, aby došlo k zesílení těchto látek ve výsledném produktu. (Mosher, 2017)

3.5.4 Trapistická piva

V době středověku na území tehdejší Francie vznikl řád Trapistických mnichů, kde si mniši v klášterech vařili pivo pro místní komunitu. (Mosher, 2017) Tento produkt je známý svou vysokou kvalitou, čímž si na světovém trhu udržuje důležité postavení. Proto Trapistická piva dostala ochrannou známku. Pivo musí být vařeno na území jednoho z klášterů Řádu Cisterciánů, za dodržení přísných kvalitativních a tradičních norem mající dlouhou historii mezi klášterní komunitou. (Mannina, 2016b)

Jednou z podmínek pro toto pivo je, že musí být uvařeno v Trapistickém klášteře, kdy jej musí vařit sami mniši, nebo na samotnou výrobu musí alespoň dohlížet. Další podmínkou je, že výroba piva nesmí být primárním prostředkem k obživě. Mniši si tak musí nechat peníze z prodeje pouze na pokrytí jejich životních potřeb a vše co si vydělají navíc, věnují na charitu. Pokud nejsou dodrženy tyto podmínky nesmí být pivo prodáváno pod názvem Trapista, ale lze toto pivo s podobnými vlastnostmi označit jako Abbey Ale. (Mosher, 2017) Aby nedocházelo k zneužívání této ochranné známky, založili mniši Mezinárodní trapistickou asociaci, která sdružuje 20 z celkových 175 klášterů. Při dodržení všech kvalitativních a tradičních standardů, lze pivo označit jako „Originální Trapistický produkt“. Z 20 klášterů, které patří do Mezinárodní trapistické organizace smí vařit pivo pouze 12 klášterů (Mannina, 2016b), které mají povolení vařit a prodávat pivo pod názvem Trapista či Trapistický Ale. (Mosher, 2017)

Nejstarším Trapistickým pivovarem, který začal vařit pivo již v roce 1595 leží na území dnešní Belgie a jmenuje se Basserie du Rochefort. (Mosher, 2017) Na území Belgie se jich nachází šest, a to klášter Achel, Scourmont Lez Chimay, Westvleteren, Orval, již zmíněný Rochefort a Westmalle. Dva jsou v Nizozemsku Koningshoeven v Tilburgu, Maria Toevlucht v Zundertu, jeden v Rakousku Stift Engelszell a jeden také ve Francii Mont des Cats. V italském Římě je klášter Tre Fontane a ve Spojených státech Amerických je to klášter St. Joseph ve Spenceru. Všechny těchto dvanáct klášterů vaří své pivo, jen francouzský klášter Mont des Cats nemůže své pivo označovat ochrannou známkou jako originální trapistický produkt. (Mannina, 2016b)

3.5.5 NMR analýza piva

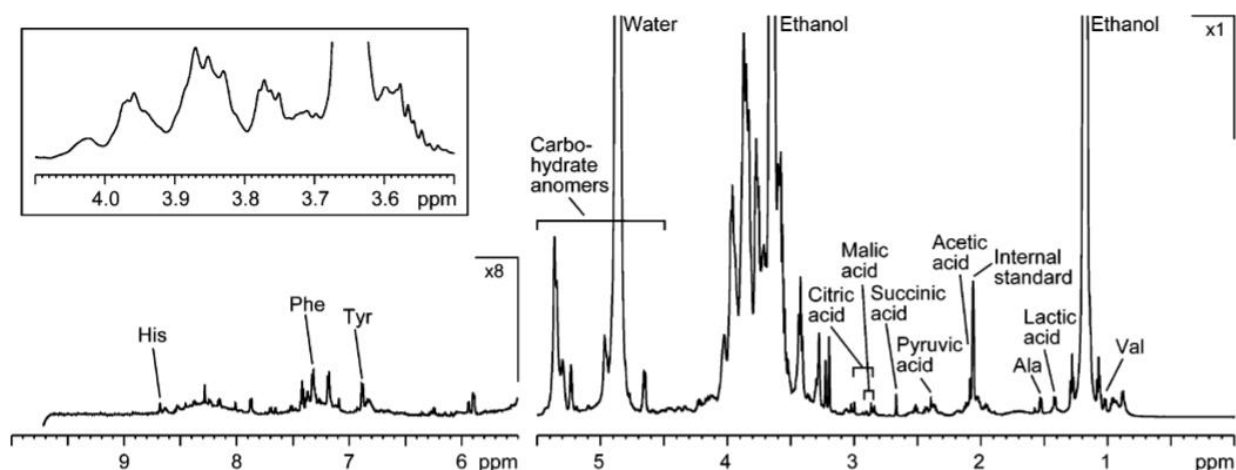
NMR spektroskopie nám dává možnost zaměřit se pouze na požadované informace a můžeme tak nahlédnout do toho jaké jsou hlavní a vedlejší sloučeniny. Dává nám také celkový otisk, který je pro každé pivo specifický. U čerstvého piva je problém s interpretací spekter kvůli vodě a ethanolu, a to z důvodu většího píku než sledovaných sloučenin, které jsou zastoupeny v menším množství. Proto je nemožné získat přesnou chemickou informaci o pivu bez potlačení rozpouštědla. K vyřešení tohoto problému byly navrženy postupy jako pulzní sekvence umožňující potlačení jednoho nebo obou signálů – lyofilizace vzorku či vakuová destilace, kdy dochází k odstranění rozpouštědla. (Jeong, 2017) Před analýzou piva na NMR je potřeba vzorek pouze odplynit. Díky této analýze můžeme mít obsáhlé informace o vzorku do několika minut. Je vytvořena databáze sloučenin nalezených v pivu. Jedná se hlavně o sacharidy a aromatické sloučeniny. Velké množství spekter piva, vede k překrývání signálů a s tím vznikají potíže při získávání podrobných informací o složení piva. (Almeida, 2006) Je také možné odhalit podvody s prodejem jiných značek u točených piv, než je deklarováno výčepním a nápojovým lístkem. (Kuballa, 2018)

NMR analýzou lze určit původ potravin, což dává možnost určit konkrétní sloučeniny ovlivňující kvalitu výsledného produktu. U piva bylo přezkoumáváno použití metody místně specifické přírodní izotopové frakcionace NMR (SNIF-NMR). (Almeida, 2006) V dnešní době se již (SNIF)-NMR pro rutinní analýzy piva nevyužívá a žádná databáze izotopových poměrů nebyla vytvořena. Piva vyrobená v Německu, Francii a Belgii bylo možné hrubě zeměpisně rozlišit na základě poměru D/H. (Kuballa, 2018) Studie piv pomocí NMR spektroskopie zahrnovaly kvantifikaci organických kyselin a aminokyselin, rozpoznání mezi pivy svrchně a spodně kvašenými, značkou a variabilitou dle místa výroby. (Rodrigues, 2011a) Jako potencionální nástroj pro kontrolu piva se využívá vícerozměrná analýza dat NMR a FTIR. PCA u FTIR vedla k oddělení piva podle obsahu alkoholu, zatímco PCA u ^1H NMR vedla k rozdělení piv do čtyř skupin. Většina piv typu ale, ležáky a piva bez alkoholu byla identifikována podle jejich aromatického složení, které bylo identifikováno pomocí 2D NMR. Látky, které byly identifikovány jsou deriváty nukleových kyselin, tyrosin, prolin, kyselina jantarová, kyselina mléčná, tyrosol a isopropanol, cholin a sacharidy. (Kidrič, 2008)

^1H NMR má krom ethanolu vysokou detekci specifických sloučenin a stává se tím jednou z nejstabilnějších spektroskopických metod. Bylo prokázáno, že vícerozměrná profilová analýza ^1H NMR dokáže detekovat pravidelné změny složení mezi ležáky, pivy typu ale a nealkoholickými pivy, a také mezi pivy u kterých byl použit pšeničný nebo ječmenný slad. Lze také touto metodou kvantifikovat složky piva, nejčastěji aminokyseliny a organické kyseliny. (Almeida, 2006) NMR je v pivovarském průmyslu nejvíce využíváno k rozpoznání a kvantifikaci sloučenin ze sladu a chmele. Těmito složkami jsou polyfenoly, humulony, lupulony a *iso*-humulony. (Lachenmeier, 2005) NMR byla u piva použita pro identifikaci ve vodě rozpustných arabinoxylanů a flavanolglukosidu z ječmene a ječmenného sladu. Pro charakterizaci piva byla použita NMR s vysokým rozlišením a vícerozměrná analýza dat. Pro identifikaci tyrosolu, tryptofolu a fenylethanolu byla použita LC-NMR nebo také MS. (Kidrič, 2008) Almeida et al. prováděli kvantifikaci pomocí integrace signálu NMR s použitím referenčních roztoků a částečnou regresí nejmenších čtverců (PLS). PLS zlepšuje přesnost výsledků a umožňuje manipulaci i s překrývajícími se signály. Získané výsledky porovnával s výsledky analýzy na HPLC, kde stanovoval aminokyseliny a s výsledky z kapilární elektroforézy kde stanovoval organické kyseliny. (Almeida, 2006) Kombinace NMR analýzy s kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií umožnilo rozpoznat oligosacharidy a aromatické sloučeniny. (Lachenmeier, 2005) V roce 2016 byla poprvé během výroby piva, kdy díky tepelné přeměně glutaminu a kyseliny glutamové vznikla a byla identifikována kyselina pyroglutamová. (Mannina, 2016b)

Na obrázku číslo 3 je vidět NMR spektrum piva na kterém dominuje voda a ethanol. Pomocí presaturace byl zmírněn signál vody a dosahoval tak podobných hodnot jako ethanol a dále již nebylo potřeba tyto signály více potlačovat. V oblasti δ 1,4–3,2 ppm můžeme pozorovat slabší signály od organických kyselin. Referenční spektrum kyseliny pyruvové se nacházelo v oblasti δ 1,58 ppm, které bylo přiřazeno methylové skupině hydratované formy kyseliny pyrohroznové. Hydratovaná forma vzniká jednodušeji v kyselém prostředí. Jelikož byla tato

kyselina přítomná ve spektrech piva byla zahrnuta do signálů ke kvantifikaci piv pomocí NMR. Dobře pozorovatelné jsou oblastech δ 3,2 – 4,2 a 4,5 – 5,5 ppm netěkavé sloučeniny a sacharidy. V aromatické oblasti δ 6,5 – 8,8 ppm nacházíme mnoho slabých signálů pocházejících od aromatických aminokyselin, bází nukleových kyselin či fenolových sloučenin. (Nord, 2004)



Obrázek 3. NMR spektrum piva (přejato z Nord,2004)

Rodrigues et al. se zaměřili na testování piv po nuceném stárnutí piva a získali výsledky změn ve složení. Piva stárla při 45 °C po dobu 18 dní. Stárnutí piva se většinou studuje s přihlédnutím k 3–7dennímu tepelnému ošetření (při 37-45 °C). Proto prodloužená doba nemusí odrážet relativně přesné podmínky skladování piva. V jejich práci byly však tyto podmínky použity záměrně, aby došlo ke zlepšení složení, což mělo za výsledek lepší měřitelnost a reprodukovatelnost pomocí NMR. K vyhodnocení použili vícerozměrnou analýzu dat (MVA), konkrétně analýzu hlavních složek (PCA) a částečnou analýzu nejmenších čtverců (PLS-DA). Údaje z NMR umožnily posouzení hlavních chemických změn profilu piv během stárnutí, což umožnilo identifikaci konkrétních sloučenin. Byla také provedena 2D korelační analýza, která má své využití spíše u vína. Ta potvrdila, že příslušené sloučeniny se během stárnutí mění. To poukazuje na specifické změny jak chemické, tak biochemické během stárnutí. (Rodrigues, 2011a)

Výsledkem jejich práce byl viditelný jasný trend, kdy čerstvé pivo a pivo až do třetího dne stáří, vykazovalo vyšší hodnoty GABA, kyseliny gallové, lineární dextriny a bylo chudší na 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), vyšší alkoholy, kyselinu octovou, kyselinu mravenčí, kyselinu pyrohroznovou a kyselinu jantarovou. Od čtvrtého do třináctého dne stárnutí se situace otočila a převažoval 5-HMF nad GABA. GABA se zdá být jako důležitý substrát pro Maillardovu reakci, s přímým dopadem na vznik kyseliny jantarové a kyseliny pyrohroznové. (Rodrigues, 2011a)

Tabulka 3. Systematický přehled vědeckých studií zaměřených na NMR analýzu piva

Autor	Počet vzorků	Pivo	Příprava před analýzou	NMR	pH	Statistická analýza dat	Kvantifikace	Výsledky
(Nord, 2004)	58	ležák	odplynění v ultrazvukové lázni	Bruker DRX 600 vybavený 5 mm trojitou rezonanční inverzní sondou, standardní pulzní sekvence pro presaturaci, akviziční čas 2,7 s, doba relaxace 1,0 s.	1,93 (±0,18)	PCA, PLS	alanin, histidin, fenylalanin, tyrosin, valin, k. octová, k. citrónová, k. mléčná, k. jablečná, k. pyrohroznová, k. jantarová	Kvantifikované organické kyseliny a aminokyseliny dávají signály v regionech pivního spektra relativně volně od ostatních sloučenin, a proto byly vybrány pro kvantifikaci v pivu pomocí NMR. Integrace těchto signálů a použití referenčních spekter umožnilo kvalitativní stanovení těchto sloučenin ve všech 58 vzorcích piva. NMR kvantifikace se korelovala s kvantifikací z HPLC (aminokyseliny) a kapilární elektroforézy (organické kyseliny). Dobré korelace vycházely u aminokyselin a k. mléčné. Špatná korelace u k. jablečné byla odůvodněna slabými signály. Pomocí NMR zle detekovat aminokyseliny již v koncentracích 5–10 mg/L, mez detekce by se dala snížit nejméně o faktor 10, použitím vyšší intenzity pole či využitím technologie kryoprobe. U organických kyselin je mez detekce přibližně 30 mg/ml.
(Rodriguez, 2010)	14	ležák	odplynění v ultrazvukové lázni	Bruker Avance DRX 500 s použitím pulzní sekvence noesypr1d, presaturace H ₂ O. (presaturace Et-OH) nebyla použita, Akviziční čas 2,0 s, doba relaxace 5 s.	1,90 (±0,03)	PLS1 NMR	k. octová, k. citrónová, k. mléčná, k. jablečná, k. pyrohroznová, k. jantarová	PLS1-NMR je vhodná pro kvantifikaci organických kyselin. Přímá PLS1-NMR/CE je vhodná pro stanovení kyseliny octové a mléčné. Nepřímá PLS1-NMR/CE pro k. jablečnou, k. pyrohroznovou a jantarovou. Enzymatická PLS-NMR je vhodná pro k. citronovou.

Autor	Počet vzorků	Pivo	Příprava před analýzou	NMR	pH	Statistická analýza dat	Kvantifikace	Výsledky
(Almeida, 2006)	27	ležák (4 % obj alkohol.)	odplynění v ultrazvukové lázni	Bruker Avance DRX-500 pracující při 500,13 MHz. Potlačení H ₂ O a Et-OH pomocí 2D NOE, Akviziční čas 1,95 s, doba relaxace 8,0 s	4,21 - 4,53	PCA	k. mléčná, k. pyrohroznová, tyrosin, uridin, adenosin/inosin, k. jantarová, histidin	Byl zjištěn rozdíl mezi obsahem k. mléčné a k. pyruvové v závislosti na místě výroby. Je možný vliv kvasinek a jejich vitalita. U piv A a C bylo zjištěno více rozvětvených dextrinů naproti tomu piv B bylo více lineárních nerozvětvených dextrinu. Obsah dextrinu může být ovlivněn při výrobě sladu či rmutování a výslednou enzymatickou aktivitou. Všechna tři místa (A, B, C) byla úspěšně rozlišena podle obsahu adenosinu/inosinu, tyrosinu/tyrosolu a 2-fenylethynolu.
(Duarte, 2004)	50	ležák (Ø4,9 %), ALE (Ø5,9 %), nealkoholické pivo (<0,5 %)	odplynění v ultrazvukové lázni	spektrometr Bruker Avance DRX-600, 600 MHz pulsní sekvence NOESYPR1DSP. Potlačení H ₂ O i Et-OH, čas akvizice 1,95 s, čas relaxace 1,6 s	4,16	PCA	propanol, isobutanol, isopentanol, k. citronová, k. jablečná, k. pyrohroznová, k. octová, k. sukcinová, alanin, prolin, tyrosin, fenylalanin, glukóza, maltóza, nukleosidy	PCA vedla k rozpoznání piv podle jejich základní vlastností. PCA spektra FTIR poskytla přímé informace o obsahu ethanolu, přičemž se povedlo rozpoznat piva s vyšším obsahem alkoholu než 6 % od ostatních piv. PCA u ¹ H NMR poskytla krom ethanolu informace o sacharidech a dokázala piva rozpoznat podle obsahu dextrinu, maltózy a glukózy. Mimo jiné byla nalezena také nepřímá korelace mezi profilem sacharidů a obsahem ethanolu, což odráží různé technologické procesy. V alifatické oblasti byla zvláště citlivá a rozpoznala ležák, ale i pivo bez alkoholu.

Autor	Počet vzorků	Pivo	Příprava před analýzou	NMR	pH	Statistická analýza dat	Kvantifikace	Výsledky
(Mannina, 2016b)	233	svrchně kvašená	odplynění v ultrazvukové lázni	Spektrometr Bruker AVANCE 600, pracující při 600,13 MHz, vybaven více jadernou inverzní sondou Bruker. Použití pulsní sekvence ¹ H NMR, založené na experimentu 1D NOESY, se supesí H ₂ O a Et-OH, relaxační zpoždění 6, 3 s s aplikací modulovaného tvarovaného pulsu pro presaturaci mimo rezonanci.	N/A	PLS-DA	acetaldehyd, k. octová, adenosin, alanin, cholin, k. citronová, cytidin, ethylacetát, k. mravenčí, k. fumarová, GABA, k. gallová, histidin, isobutanol, isopentanol, k. mléčná, fenylalanin, 2-fenylethanol, prolin, propanol, tyrosin, uridin, k. pyruvová	<p>Poprvé identifikována k. pyroglutamová.</p> <p>V trappistických pivech bylo více kyseliny mravenčí, neznámé sloučeniny X4 a k. pyrohroznové. V ostatních pivech bylo více neznámé sloučeniny X6, k. octové a alaninu.</p> <p>U piva typu Rochefort byli vyšší hladiny k. mravenčí, k. pyrohroznové, isopentanolu a propanolu.</p>
(Rodriguez, 2011a)	27	ležák	odplynění v ultrazvukové lázni	Bruker Avance DRX 500 s 5 mm inverzní sondou při 300 K, pulzní noesyprd sekvence s presaturací H ₂ O (presaturace Et-OH neproběhla), akviziční čas 2,0 s, doba relaxace 5,0 s	1,90 (±0,03)	PCA, PLS-DA	V čerstvých pivech bylo více vyšších alkoholů (isobutanol, isopentanol, propanol, tyrosol, fenylethanol), ethanol, organické kyseliny (k. octová, k. citronová, k. mléčná, k. jablečná, k. pyruvová, k. jantarová), aminokyseliny (GABA, alanin, prolin, tyrosin, fenylalanin), zkvasitelné cukry (maltóza, trehalóza), nukleosidy (cytidin, uridin) k. gallová, k. mravenčí, 5-HMF	<p>Čerstvá piva (do 3.dne) obsahovala více GABA, k.gallové a méně 5-HMF, vyšších alkoholů, k. octové, k. mravenčí, k. pyrohroznová, k. jantarová.</p> <p>Od 5. dne se zvyšuje obsah 5-HMF spolu s organickými kyselinami a méně GABA.</p> <p>V posledních stadiích (13. a 18.den) dochází k poklesu k. octové, k. pyruvové, k. jantarové. 5-HMF je v této fázi nejvýznamnějším makrem stárnutí (lineární zvýšení během stárnutí).</p>

Autor	Počet vzorků	Pivo	Příprava před analýzou	NMR	pH	Statistická analýza dat	Kvantifikace	Výsledky
(Petersen, 2014)	6	ležák, asijský ležák, bezalkoholický dánský ležák, dánský ale, porter, organický a pšeně	odplynění opakovaným mícháním a uvolňováním CO ₂ , lyofilizace	Spektrometr Bruker 800MHz DRX s TCI CryoProbe a 18,7 T magnetem pracující při 37 °C / Bruker DRX 600 MHz s teploměrem místnosti BBO SmartProbe, akviziční čas 1,63 s, doba relaxace 3 s	N/A	DOSY	U asijských ležáků chybí fragmenty β-glukanů, u ostatních typů různé hladiny fragmentů β-glukanu. U ležáků se vyskytoval β-(1-3) glukopyranosyl. Frakce třech substituovaných xylopyranosylových skupin byla vyšší u pšeničných piv.	Piva z ječmene vykazovala hlavní frakci nesubstituovaného D-xylopyranosylu a mírně menší frakci 2,3-disubstituovaných D-xylopyranosylových skupin pouze s malou frakcí 3-substituovaných skupin. Byly identifikovány strukturální motivy na štěpných místech u škrobu, β-glukanu a arabinoxytanu, jež ukazují různý rozsah a specifitu enzymatického štěpení polysacharidů během výroby piva.
(Jeong, 2017)	23	ležák, piva typu Ale	1)odplynění v ultrazvukové lázni 2)lyofilizace vzorků	Spektrometr Bruker Avance III Ascend™ 400 MHz při teplotě 298 K s potlačením H ₂ O, relaxační zpoždění 1 s.	3,9 - 4,5	PCA/PLS	propanol, isobutanol, isopentanol, ethanol, k. mléčná, prolin, k. octová, k. pyruvová, GABA, k. jantarová, glukóza, dextrin, uridin, cytidin, adenosin, tyrosin, histidin, 2-fenylethanol, tryptofan, polyfenol	10 lyofilizovaných vzorků piva typu ale vykazovalo podobné píky, a i jejich intenzitu, až na sloučeniny v kyselé oblasti a množství adenosinu. 13 vzorků lyofilizovaných ležáků vykazovalo téměř stejné množství i zastoupené chemických sloučenin, až na alkohol. Lyofilizace vzorků činí multivariační analýzu efektivnější kvůli lepší čitelnosti b aromatické oblasti spektra.

Autor	Počet vzorků	Pivo	Příprava před analýzou	NMR	pH	Statistická analýza dat	Kvantifikace	Výsledky
(Duarte, 2002)	17	ležák, piva typu Ale	odplynění v ultrazvukové lázni	Spektrometr Bruker Avance DRX-600, pracující při 599,87 MHz, použita sekvence impulzů 1D NOESY, signály H ₂ O a Et-OH potlačeny, relaxační zpoždění 1,5 s	3,7 - 4,4	PCA	acetaldehyd, k. mléčná, k. jablečná, k. octová / acetáty, adenosin / inosin, maltóza, maltotrióza, dextriny, prolin, alanin, k. citrónová, cytosin, propanol, ethanol, ethylester, k. pyrohroznová, diacetyl, k. mravenčí, k. jantarová, GABA, tryptofan, kovová kyselina, histidin, tyrosin, isobutanol, uridin, isopentanol	Spektra 17 vzorků piv dokazují, že mohou piva lišit. Jeden vzorek ležáku obsahoval mnohonásobně více glukózy oproti ostatním. Výsledky PCA ukazují, že piva typu ale a ležáky jsou rozdílná ve složení aromatických látek. Lze té rozpoznat zeměpisný původ, technologii výroby a je reprodukovatelný v různých pivovarských lokalitách.

4 Závěr

Tato bakalářská práce se zaměřila na novou perspektivní metodu nukleární magnetickou rezonanci (NMR), která získává na popularitě a využívá se k detekci falšování potravin nebo také k určení geografického původu, Chráněného zeměpisného označení či Chráněného označení původu. NMR neničí analyzovaný vzorek a nepotřebuje kalibraci pomocí standardů. Z výsledného NMR spektra lze rozpoznat jak kvalitativní, tak kvantitativní zastoupení chemických sloučenin. Více se využívá kvantitativního zastoupení chemických sloučenin. K nejčastěji falšovaným komoditám patří víno, pivo, med a olivový olej.

Pomocí NMR spekter lze u vína identifikovat 30–50 sloučenin. NMR analýzy potravin mají vysokou reprodukovatelnost a přesnost. Vzájemné poměry a zastoupení chemických sloučenin mohou být markerem určité odrůdy, nebo vinařské oblasti a lze tak s přesností rozpoznat i vína nesoucí chráněná označení. Každá vinařská oblast je ovlivněna svým terriorem, který má tak specifické zastoupení sloučenin. Aminokyselina prolin se zdá být vhodným markerem pro určení zralosti, klimatických podmínek na vinohradu při zrání hroznů a poté i u vína.

Dalším často falšovaným nápojem je pivo. Většina nalezených studií se zabývala z největší části, zdali je NMR spektroskopie schopna rozpoznat rozdíl mezi pivy svrchně a spodně kvašenými. Stejně jako u vína byla metoda NMR schopna rozlišit piva z různých regionů. ^1H NMR spektroskopie dokáže detekovat změny složení mezi ležáky, pivy typu ale a nealkoholickými pivy, a také zdali byl použit pšeničný nebo ječmenný slad. NMR je v pivovarském průmyslu nejvíce využívána k rozpoznání a určení množství sloučenin ze sladu a chmele. NMR analýzám Českého piva se žádná studie nevěnovala.

5 Citovaná literatura

- AGOSTINO, Maria Rosaria a Francesco TRIVIERI, 2014. Geographical indication and wine exports. An empirical investigation considering the major European producers. *Food Policy*. **46**, 22-36.
- ALANÓN, M.E., M.S. PÉREZ-COELLO a M.L. MARINA, 2015. Wine science in the metabolomics era. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **74**, 1-20.
- ALMEIDA, Cláudia, Iola F. DUARTE, António BARROS, João RODRIGUES, Manfred SPRAUL, Ana M. GIL, 2006. Composition of Beer by ¹H NMR Spectroscopy: Effects of Brewing Site and Date of Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**, 700-706.
- ANASTASIADI, Maria, Athina ZIRA, Prokopios MAGIATIS, Serkos A. HAROUTOUNIAN, Alexios Leandros SKALTSOUNIS a Emmanuel MIKROS, 2009. ¹H NMR-Based Metabonomics for the Classification of Greek Wines According to Variety, Region, and Vintage. Comparison with HPLC Data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**, 11067-11074.
- BANSAL, Sangita, Apoorva SINGH, Manisha MANGAL, Anupam K. MANGAL a Sanjiv KUMAR, 2016. Food adulteration: Sources, health risks, and detection methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **57**, 1174-1189.
- BHARTI, Santosh Kumar a Raja ROY, 2012. Quantitative ¹H NMR spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **35**, 5-26.
- CAPONE, Roberto, Hamid EL BILALI, Philipp DEBS, Gianluigi CARDONE a Nouredin DRIOUECH, 2014. *Food System Sustainability and Food Security: Connecting the Dots*.
- CARR, Frank J., Don CHILL a Nino MAIDA, 2008. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*. **28**, 281-370.
- CONNELLY, Ricky a Marie MAHON, 2015. Protected geographical indications: Institutional roles in food systems governance and rural development. *Geoforum*. **60**, 14-21.
- DOWNEY, Gerard, 2016. *Advances in food authenticity testing*. Boston, MA: Elsevier.
- DUARTE, Iola, António BARROS, Peter S. BELTON, Renton RIGHELATO, Manfred SPRAUL, Eberhard HUMPFER a Ana M. GIL, 2002. High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Analysis for the Characterization of Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**, 2475-2481.
- DUARTE, Iola F., António BARROS, Cláudia ALMEIDA, Manfred SPRAUL a Ana M. GIL, 2004. Multivariate Analysis of NMR and FTIR Data as a Potential Tool for the Quality Control of Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**, 1031-1038.
- FOTAKIS, Charalambos, Katerina KOKKOTOU, Panagiotis ZOUMPOULAKIS a Maria ZERVOU, 2013. NMR metabolite fingerprinting in grape derived products: An overview. *Food Research International*. **54**, 1184-1194.
- GENISHEVA, Z., S.I. MUSSATTO, J.M. OLIVEIRA a J.A. TEIXEIRA, 2013. Malolactic fermentation of wines with immobilized lactic acid bacteria – Influence of concentration, type of support material and storage conditions. *Food Chemistry*. **138**, 1510-1514

- GODELMANN, Rolf, Fang FANG, Eberhard HUMPFER, Birk SCHÜTZ, Melanie BANSBACH, Hartmut SCHÄFER a Manfred SPRAUL, 2013. Targeted and Nontargeted Wine Analysis by ^1H NMR Spectroscopy Combined with Multivariate Statistical Analysis. Differentiation of Important Parameters: Grape Variety, Geographical Origin, Year of Vintage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **61**, 5610-5619.
- GOUGEON, Louis, Gregory DA COSTA, François GUYON a Tristan RICHARD, 2019. ^1H NMR metabolomics applied to Bordeaux red wines. *Food Chemistry*. **301**
- HOLMBERG, 2010. Wine fraud. *International Journal of Wine Research*. **2010**, 10.
- HONG, Eunyoung, Sang Yoo LEE, Jae Yun JEONG, Jung Min PARK, Byung Hee KIM, Kisung KWON a Hyang Sook CHUN, 2017. Modern analytical methods for the detection of food fraud and adulteration by food category. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **97**, 3877-3896.
- HONG, Young-Shick, 2011. NMR-based metabolomics in wine science. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **49**, S13-S21.
- JEONG, Ji-Ho, Sung-Jin CHO a Yongae KIM, 2017. High-Resolution NMR Spectroscopy for the Classification of Beer. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. **38**, 466-470.
- KIDRIČ, J., 2008. *Chapter 5 NMR Study of Beverages*. Elsevier, 2008, 161-171. Annual Reports on NMR Spectroscopy.
- KUBALLA, Thomas, Tobias Stephan BRUNNER, Tienthong THONGPANCHANG, Stephan Gerhard WALCH a Dirk Walter LACHENMEIER, 2018. Application of NMR for authentication of honey, beer and spices. *Current Opinion in Food Science*. **19**, 57-62.
- LACHENMEIER, Dirk W, Willi FRANK, Eberhard HUMPFER, Hartmut SCHÄFER, Silke KELLER, Monika MÖRTTER a Manfred SPRAUL, 2005. Quality control of beer using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis. *European Food Research and Technology*. **220**, 215-221.
- LACHENMEIER, D.W., 2016. Advances in the Detection of the Adulteration of Alcoholic Beverages Including Unrecorded Alcohol. *Advances in Food Authenticity Testing*. Elsevier, 2016, 565-584.
- LEE, Jang-Eun, Geum-Sook HWANG, Frans VAN DEN BERG, Cherl-Ho LEE a Young-Shick HONG, 2009. Evidence of vintage effects on grape wines using ^1H NMR-based metabolomic study. *Analytica Chimica Acta*. **648**, 71-76.
- LÓPEZ-RITUERTO, Eva, Susana CABREDO, Martina LÓPEZ, Alberto AVENOZA, Jesús H. BUSTO a Jesús M. PEREGRINA, 2009. A Thorough Study on the Use of Quantitative ^1H NMR in Rioja Red Wine Fermentation Processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**, 2112-2118.
- LÓPEZ-RITUERTO, Eva, Francesco SAVORANI, Alberto AVENOZA, Jesús H. BUSTO, Jesús M. PEREGRINA a Søren Balling ENGELSEN, 2012. Investigations of La Rioja Terroir for Wine Production Using ^1H NMR Metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **60**, 3452-3461.
- LÓPEZ-RITUERTO, Eva, Francesco SAVORANI, Alberto AVENOZA, Jesús H. BUSTO, Jesús M. PEREGRINA a Søren Balling ENGELSEN, 2012. Investigations of La Rioja Terroir for Wine Production Using ^1H NMR Metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **60**, 3452-3461.

- MANNINA, L., S. CIRCI a A.P. SOBOLEV, 2016a. 6 - Advances in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Food Authenticity Testing. *In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Advances in Food Authenticity Testing, Woodhead Publishing, 2016.* s. 147-170
- MANNINA, Luisa, Federico MARINI, Riccarda ANTIOCHIA, Stefania CESA, Antonio MAGRÌ, Donatella CAPITANI a Anatoly P. SOBOLEV, 2016b. Tracing the origin of beer samples by NMR and chemometrics: Trappist beers as a case study. *ELECTROPHORESIS*. **37**, 2710-2719.
- MAROVA, Ivana, Katerina PARILOVA, Zdenek FRIEDL, Stanislav OBRUCA a Katerina DURONOVA, 2011. Analysis of Phenolic Compounds in Lager Beers of Different Origin: A Contribution to Potential Determination of the Authenticity of Czech Beer. *Chromatographia*. **73**, 83-95.
- MICHLOVSKÝ, Miloš, 2017. *Vinohradnictví*. Rakvice: Vinselekt Michlovský.
- MINOJA, Anna Paola a Claudia NAPOLI, 2014. NMR screening in the quality control of food and nutraceuticals. *Food Research International*. **63**, 126-131.
- MONAKHOVA, Yulia B., Hartmut SCHÄFER, Eberhard HUMPFER, Manfred SPRAUL, Thomas KUBALLA a Dirk W. LACHENMEIER, 2011. Application of automated eightfold suppression of water and ethanol signals in ¹H NMR to provide sensitivity for analyzing alcoholic beverages. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **49**, 734-739.
- MOSHER, Michael a Kenneth TRANTHAM, 2017. Beer Styles. MOSHER, Michael a Kenneth TRANTHAM. *Brewing Science: A Multidisciplinary Approach*. Cham: Springer International Publishing, 35-61
- NILSSON, Mathias, Iola F. DUARTE, Cláudia ALMEIDA, Ivonne DELGADILLO, Brian J. GOODFELLOW, Ana M. GIL a Gareth A. MORRIS, 2004. High-Resolution NMR and Diffusion-Ordered Spectroscopy of Port Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**, 3736-3743.
- NORD, Lars I., Pia VAAG a Jens Ø. DUUS, 2004. Quantification of Organic and Amino Acids in Beer by ¹H NMR Spectroscopy. *Analytical Chemistry*. **76**, 4790-4798.
- OGRINC, N., I. J. KOŠIR, J. E. SPANGENBERG a J. KIDRIČ, 2003. The application of NMR and MS methods for detection of adulteration of wine, fruit juices, and olive oil. A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **376**, 424-430.
- OLŠOVSKÁ, J., P. ČEJKA, K. SIGLER a V. HÖNIGOVÁ, 2014. *The phenomenon of Czech beer: a review. Czech J. Food Sci.*, **32**: 309–319. 309–319.
- PARGA-DANS, Eva a Pablo ALONSO GONZÁLEZ, 2017. ‘Marketing quality’ in the food sector: Towards a critical engagement with the ‘quality turn’ in wine. *Geoforum*. **85**, 5-8.
- PEREIRA, Giuliano E., Jean-Pierre GAUDILLERE, Cornelis VAN LEEUWEN, et al., 2005. ¹H NMR and Chemometrics To Characterize Mature Grape Berries in Four Wine-Growing Areas in Bordeaux, France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**, 6382-6389.
- PETERSEN, Bent O., Mathias NILSSON, Marie BØJSTRUP, Ole HINDSGAUL a Sebastian MEIER, 2014. ¹H NMR spectroscopy for profiling complex carbohydrate mixtures in non-fractionated beer. *Food Chemistry*. **150**, 65-72.
- RENOUF, Vincent, Arnaud DELAHERCHE, Olivier CLAISSE a Aline LONVAUD-FUNEL, 2008. Correlation between indigenous *Oenococcus oeni* strain resistance and the presence of genetic markers. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **35**, 27-33.

- RODRIGUES, J.A., A.S. BARROS, B. CARVALHO, T. BRANDÃO a Ana M. GIL, 2011a. Probing beer aging chemistry by nuclear magnetic resonance and multivariate analysis. *Analytica Chimica Acta*. **702**, 178-187.
- RODRIGUES, J.E.A., G.L. ERNY, A.S. BARROS, V.I. ESTEVES, T. BRANDÃO, A.A. FERREIRA, E. CABRITA a A.M. GIL, 2010. Quantification of organic acids in beer by nuclear magnetic resonance (NMR)-based methods. *Analytica Chimica Acta*. **674**, 166-175.
- RODRIGUES, J. E. a A. M. GIL, 2011b. NMR methods for beer characterization and quality control. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **49**, S37-S45.
- ROCHFORT, Simone, Vilnis EZERNIEKS, Susan E.P. BASTIAN a Mark O. DOWNEY, 2010. Sensory attributes of wine influenced by variety and berry shading discriminated by NMR metabolomics. *Food Chemistry*. **121**, 1296-1304.
- SILVA, Vanessa, Gilberto IGREJAS, Virgílio FALCO, et al., 2018. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds extracted from wine industry by-products. *Food Control*. **92**, 516-522.
- SOBOLEV, Anatoly P., Freddy THOMAS, James DONARSKI, Cinzia INGALLINA, Simone CIRCI, Flaminia Cesare MARINCOLA, Donatella CAPITANI a Luisa MANNINA, 2019. 1. Use of NMR applications to tackle future food fraud issues. *Trends in Food Science & Technology*. **2019**, 7.
- SON, Hong-Seok, Ki Myong KIM, Frans VAN DEN BERG, Geum-Sook HWANG, Won-Mok PARK, Cherl-Ho LEE a Young-Shick HONG, 2008. 1 H Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabolomic Characterization of Wines by Grape Varieties and Production Areas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**, 8007-8016.
- STEVENSON, Tom, 1999. *Světová encyklopedie vín: unikátní průvodce víny celého světa*. Vyd. 2. V Praze: Balios.
- SUMBY, Krista M., Paul R. GRBIN a Vladimir JIRANEK, 2014. Implications of new research and technologies for malolactic fermentation in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **98**, 8111-8132.
- SVOBODOVÁ, Ilona, Antonín VĚŽNÍK a Michael KRÁL, 2014. Viticulture in The Czech Republic: Some Spatio-Temporal Trends. *Moravian Geographical Reports*. **22**, 2-14.
- VIGGIANI, Licia a Maria Antonietta Castiglione MORELLI, 2008. Characterization of Wines by Nuclear Magnetic Resonance: A Work Study on Wines from the Basilicata Region in Italy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**, 8273-8279.
- Bezpečnost potravin: Portál eAGRI – resortní portál MZe. *Portál eAGRI – resortní portál MZe*
 NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) č. 1308/2013: kterým se stanoví společná organizace trhů se zemědělskými produkty a zrušují nařízení Rady (EHS) č. 922/72, (EHS) č. 234/79, (ES) č. 1037/2001 a (ES) č. 1234/2007, 2013. In: 17.12.2013, 1308/2013.