

**Mendelova univerzita v Brně  
Zahradnická fakulta v Lednici**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**OXIDATIVNÍ ENZYMY V HROZNECH**

**Lednice 2017**

**Vypracoval: Martin Brázda**

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatel : **Bc. Martin Brázda**  
Studijní program: Zahradnické inženýrství  
Obor: Řízení zahradnických technologií  
Název tématu: **Oxidativní enzymy v hroznech révy vinné**  
Rozsah práce: 60 stran textu, schémat a obrázků

Zásady pro vypracování:

1. Prostudujte literaturu týkající se zadaného problému. Zaměřte se na enzymy produkované révou i kontaminujícími mikroorganismy.
2. Ve vzorcích zdravých i napadených hroznů v různých stupních zralosti stanovte aktivitu oxidativních enzymů.
3. Získané výsledky zpracujte vhodnou statistickou metodou a vyhodnoťte.

Seznam odborné literatury:

1. BRANCO, J M. – RIBÉREAU-GAYON, P. Handbook of enology. : The chemistry of wine stabilization and treatments. volume 2. Chichester, West Sussex, England. 2006. ISBN 97804700103962, 97804700103722. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/0470010398>.
2. RIBÉREAU-GAYON, P. – BRANCO, J M. Handbook of enology. : The microbiology of wine and vinifications. volume 1. Chichester, West Sussex, England. 2006. ISBN 97804700103651, 97804700103411. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/0470010363>.
3. *Wine chemistry and biochemistry*. 1. vyd. New York: Springer, 2008. 735 s. ISBN 978-0-387-74116-1.

Datum zadání diplomové práce: únor 2015

Termín odevzdání diplomové práce: květen 2017

L. S.



**Bc. Martin Brázda**  
Autor práce



**Ing. Michal Kumšta**  
Vedoucí práce



**doc. Ing. Mojmír Baroň, Ph.D.**  
Vedoucí ústavu



**prof. Ing. Robert Pokluda, Ph.D.**  
Děkan ZF MENDELU

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci: „Oxidativní enzymy v hroznech“ vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č.111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

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

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

V lednici dne.....

Podpis.....

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval vedoucímu práce ing.Kamilu Kumštovy za odborné vedení této práce.

## **Obsah**

1. ÚVOD	10
2. CÍL PRÁCE	11
3.LITERÁRNÍ ČÁST	12
3.1 Princip oxidace obecně	12
3.1.1 Enzymatická oxidace	13
3.1.2 Neenzymatická oxidace	14
4. Hlavní substráty pro enzymatickou oxidaci	16
4.1 Flavonoidy	16
4.2 Neflavonoidy	18
4.2.1 Hydroxybenzové kyseliny	18
4.2.2 Hydrokskořicové kyseliny	20
4.2.3 Těkave fenoly	21
4.3 Reakce hydroxyskořicových kyselin s antokyanů	22
5.Enzymy obecně	22
6.Oxidativní enzymy v hroznech s jejich klasifikace	23
6.1 Tyrosináza	24
6.2 Lakáza	25
6.3 Lipooxygenáza	28
7. Mechanismus aktivity oxidativních enzymů	30
7.1 Glutacion	31
7.2 Chinon vzniklý z kyseliny kaftarové a jeho možné vlastnosti	32
8. Možné ochrany moštů před oxidací	34
8.1 Oxid siřičitý	34
8.2 Kyselina askorbová	34
8.3 Chlazení moštů, které snižuje rychlost oxidačních reakcí	35

8.4 Ohřev moštů na teplotu 60 <sup>0</sup> C po dobu několika minut	36
8.5 Vyroba vína bez přístupu vzduchu v interní atmosféře	36
8.6 Použití bentonitu	36
8.7 Hyperoxidace	36
9.1 Jiné náhledy na enzymatickou oxidaci	37
10 Oxidace a redukce v moštu	39
11 Vliv zpracování hroznů na oxidaci	41
12. Experimentální část	42
12.1 Použitý materiál	42
12.2 Chemikálie	43
12.3 Úprava vzorku	43
12.4 Spektrofotometrické stanovení polyfenoloxidas	43
12.5 HPLC stanovení kyselin a cukrů	43
12.6 Výsledky analýzy	44
13 Závěr	54
14. Seznam použité literatury	55

## Abstrakt

Hlavní účel této práce je snaha o pochopit oxidaci moštu a to především enzymatickou oxidaci. Způsobují ji právě oxidativní enzymy, které se vyskytují již ve vinici na hroznech, zvláště na hroznech infikovaných houbovými chorobami. Dva hlavní oxidativní enzymy, na které je třeba se zaměřit jsou *tyrosinaza* a *lákáza*, souhrnně nazývané polyfenoloxidasí (PPO). Tyto nejvíce aktivní oxidativní enzymy, které již v počátcích výroby vína oxidují mošt a znehodnocují kvalitu budoucího vína, patří do skupiny oxidoreduktáz, kde kyslík je katalyzátorem enzymatické činnosti a fenolové sloučeniny substrátem. Dalším hlavním cílem práce je stanovit na několika vzorcích odrůd polyfenoloxidasní aktivitu a porovnat, jakým způsobem se ovlivňuje s jinými parametry vína, jako jsou například kyseliny, cukernatost atd. Bude zde probrána oxidace kyseliny kaftarové a její následná přeměna na chinony. Chinony jsou právě produktem oxidace fenolových sloučenin vlivem aktivity těchto enzymů. Kyseliny kaftarová a kumarová jsou nejvíce oxidovatelné sloučeniny pro tyto enzymy a proto bude probrána podrobněji. Je potřeba se zaměřit také možnou ochranou proti enzymatické oxidaci.

Klíčová slova: Enzymatická oxidace, polyfenoloxidasí, chinony

## Abstract

The main objective of the Thesis is to understand the oxidation of must, especially enzymatic oxidation. It is caused by the oxidative enzymes that are already present on the grapes in vineyard, especially on those badly infected by mushroom diseases. The two main oxidative enzymes that need to be targeted are *tyrosinase* and *laccase*, collectively called polyphenoloxidase (PPO). These most active oxidative enzymes, which already oxidize the must in the beginning of wine production and degrade the quality of future wine, belong to the group of oxidoreductases where oxygen is a catalyst for enzymatic activity and the phenolic compounds are substrates. Another main goal of the Thesis is to determine polyphenol oxidase activity on several samples of varieties and to compare how it affects other wine parameters such as acids, sugar content, etc. We will discuss the oxidation of gallic acid and its subsequent conversion to quinones. Quinones are just the product of the oxidation of phenolic compounds due to the activity of these enzymes. Gallic and coumaric acids are the most oxidizable



compounds for these enzymes and will therefore be discussed in more detail. It is also necessary to focus on possible protection against enzymatic oxidation.

Keywords: Enzymatic oxidation, polyfenoloxidasas, quinones

## 1. ÚVOD

Zasadní otázkou v práci na téma oxidativní enzymy, je vlastně ta, jak se co nejučiněji vyhnout působení jejich vlivu. Jejich vliv je totiž většinou negativní, protože rychle oxidují především fenolické sloučeniny na chinony a tím vlastně mošt a víno znehodnocují (oxidují) a způsobují pokles kvality vína. Je třeba se zabývat tím, jakým způsobem zpracovat hrozny a mošt, tak abychom se co nejvíce vyhnuli jejich působení. Oxidační enzymy v hroznech jsou především oxidoreduktázy, kde kyslík je katalyzátorem enzymatické činnosti a fenolové sloučeniny substrátem.

Atmosféra obsahuje přibližně 21% kyslíku na Zemi. Hraje tak zásadní roli při metabolických a chemických reakcích na Zemi. Není tedy překvapením, že hraje důležitou roli ve vinařství. Kyslík může vlastnosti moštu a vína drasticky ovlivnit, a to jak negativně, tak i pozitivně.

Je nutné tedy pochopit roli kyslíku, jemuž se samozřejmě nejde nikdy úplně vyhnout. Jak už bylo řečeno dva hlavní oxidativní enzymy, na které je třeba se zaměřit jsou *tyrosinaza* a *lákáza*, souhrně nazývané polyfenoloxidasi, u nichž je prokázáno, že nejvíce zasahují do oxidačních reakcí s fenolovými sloučeninami. Protože se jedná o oxidoreduktázy, je důležité se krátce zaměřit na princip oxido-redukčních reakcí. Neméně důležitou záležitostí je péče o hrozny již ve vinici, neboť právě houbové choroby mají nejvíce nejodolnějších oxidativních enzymů. Jedná se především o zhoubnou plíseň šedou a její napadení hroznů v různých stádiích vývoje.

## 2. CÍL PRÁCE

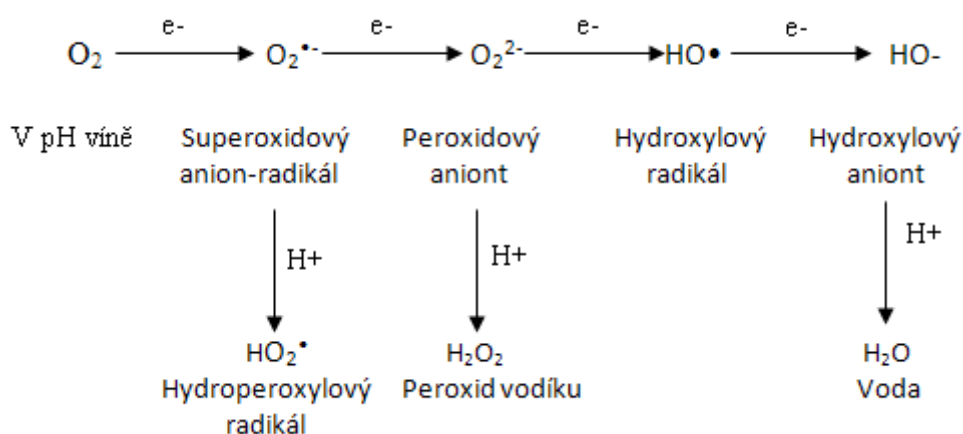
Cíl práce je pochopit princip oxidace moštu na základě pochopení aktivity oxidativních enzymů. Dalším hlavním cílem je stanovit na několika vzorcích odrůd polyfenoloxidátní aktivitu a porovnat jakým způsobem se ovlivňuje s jinými parametry vína, jako jsou např. kyseliny, cukernatost atd. Poté vyvodit shodnocení. Kyseliny kaftarová a kumarová jsou nejvíce oxidovatelné sloučeniny pro tyto enzymy a proto bude probírána podrobněji. Je potřeba se zaměřit také možnou ochranou proti enzymatické oxidaci. Větší pochopení a znalost těchto enzymů totiž dává možnost vzniku vín s vysokou komplexní kvalitou. Zabývat se touto problematikou se nám také automaticky nabízí možnost najít vhodnou alternativu k oxidu siřičitému. Je to z důvodů určitých obav, týkajících se zdraví, v důsledku závažných alergických reakcí, které vznikly u citlivých jedinců, což vedlo k regulačním omezením koncentrace  $\text{SO}_2$ , stanovenou Světovou zdravotnickou organizací (WHO) a Mezinárodní organizací pro révu a víno (OIV)

### 3.LITERÁRNÍ ČÁST

#### 3.1 Princip oxidace obecně

Oxidace je proces, kde přenos elektronů probíhá mezi redukčními a oxidačními látkami. Ve víně, je kyslík převážně zodpovědný za to, že se redukuje na určité meziprodukty a nakonec na peroxidu vodíku a potom vodou. Molekulární O<sub>2</sub> existuje jako dvojnásobný zbytek a tudíž je v tripletu. To omezuje reaktivitu O<sub>2</sub> a nemůže vytvářet vazby přijímáním elektronových párů. Avšak přidání jednoho elektronu, pocházejícího z redukovaných iontů přechodných kovů, mohou toto omezení překonat (WJ. du Toit a kol.,2006).

Je zřejmé, že fenolické molekuly jsou kvantitativně i kvalitativně důležité složky vína, zejména pak červeného vína. V průběhu oxidace je molekulární O<sub>2</sub> krok po kroku stupňovitě redukován až na 2H<sub>2</sub>O, což vyžaduje přidání čtyř elektronů. To může být ilustrováno následujícím způsobem (WJ. du Toit a kol.,2006).



Obr.č.1 Redukce kyslíku (Carla Oliviera,2011)

Oxidaci můžeme v zásadě rozdělit na a)enzymatickou oxidaci

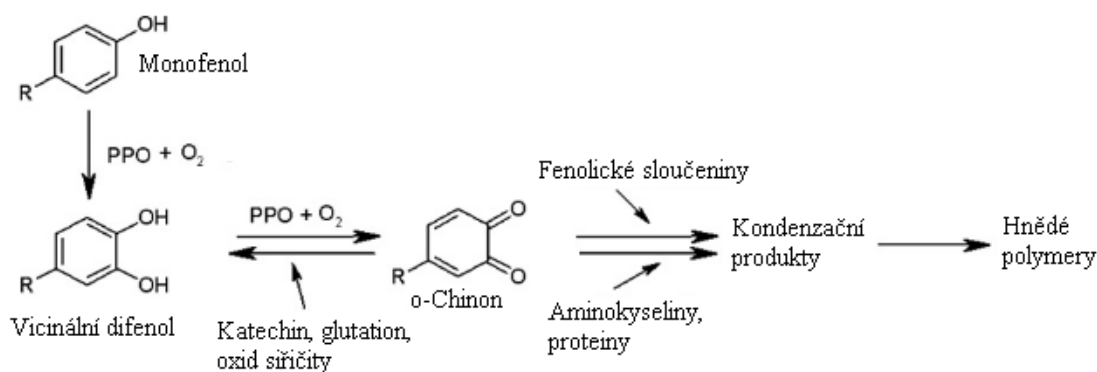
b)neenzymatickou oxidaci

### 3.1.1 Enzymatická oxidace

Enzymatickou oxidací se rozumí oxidace fenolových sloučenin (fenolové kyseliny, flavonoidní aj. látky) vzdušným kyslíkem za katalýzy oxidoreduktasami (*o*-difenol: O<sub>2</sub> oxidoreduktasami) v reakcích enzymatické oxidace. Zásadní rozdíl od chemické oxidace je v tom, že v tomto případě hrají významnou roli v oxidačních reakcích oxidativní enzymy pocházejících z hroznů v závislosti na intenzitě napadení houbovými chorobami. V poškozených rostlinných pletivech tyto enzymy katalyzují za přítomnosti vzdušného kyslíku oxidaci fenolových substrátů (tzv. monofenolů nebo *o*-difenolů) na příslušné *o*-chinony, ze kterých vznikají polymerní hnědé pigmenty. Mědnaté ionty jsou součástí aktivních center těchto enzymů, souhrně nazývány jako kuproenzymy. (Velíšek, 2002).

Od roztržení buněčné přepážky během operací vědomě nebo nevědomě prováděných na hroznech (lisování, poranění atd.) se v moštu rozpouští kyslík a indukuje celou řadu oxidačních reakcí, kterými se v různém stupni mění počáteční chemické složení moštu. Tato buněčná destrukce uvádí do styku oxidační substráty - z hroznů pocházející fenolové sloučeniny se vzdušným kyslíkem a podrobuje je aktivitám polyfenoloxidázy PPO. Barva moštu se mění a objevují se více či méně výrazné tóny hnědnutí, často se vyskytující spolu s narušením čirosti a aromatu.

Oxidace moštu zvýrazňuje soubor komplexních reakcí, jejichž mechanismy nejsou dosud příliš známé. Aktivita polyfenoloxidázy hroznů (PPO) zahrnuje aktivitu kresolázy, která katalyzuje hydroxylaci monofenolů na *o*-difenoly, a aktivitu katecholázy, katalyzující hydroxylaci orto-dihydroxylovaných fenolových sloučenin na *o*-chinony. Chinony mají zpravidla žlutou barvu, někdy se vyvíjí k hnědé nebo cihlově červené, ale jsou to látky velmi nestálé, současně mocné a silně elektrofilní oxidanty, jejichž reakce s mnohými fenolovými sloučeninami moštu vede rychle k velké rozdílnosti barevných nebo bezbarvých zplodin. Kaftarové a kutarové kyseliny hroznů jsou specifické substráty této enzymatické aktivity. (Michlovský, 2014) Obecný princip enzymatické oxidace je na obr.č.2



Obr.č.2 Mechanismus enzymatické oxidace hroznového moštu.

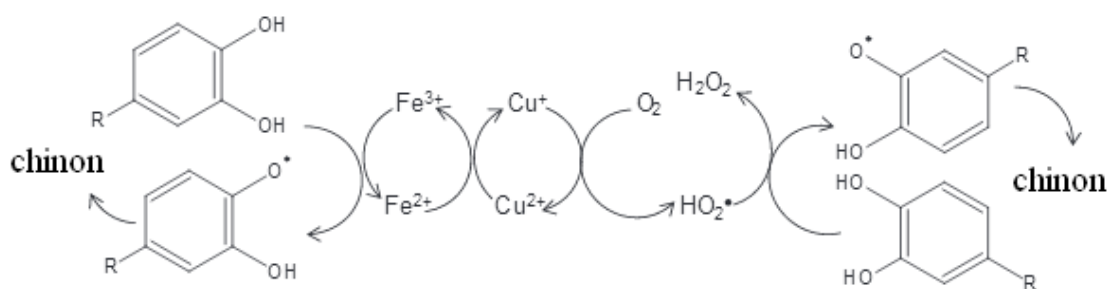
### 3.1.2 Neenzymatická oxidace

Během neenzymatické oxidace, zvané také chemická oxidace vína je nejběžnější oxidace polyfenolů obsahujících ortho-dihydroxybenzenovou část (katechol kruh), nebo 1,2,3-trihydroxybenzenovou skupinu (a galloyl skupinu), jako jsou například (+)-katechiny/(-)-Epicatechin, gallokatechin, kyselina gallová a její estery a kyselina kávová.

Tyto složky jsou snad nejsnadněji oxidovatelné, co se týče obsahu látek ve víně ( Singleton, 2000). Tyto substráty jsou postupně oxidovány na semichinon radikály a na benzochinony, zatímco kyslík se redukuje na peroxidu vodíku, a tento celý proces je zprostředkován redoxním cyklem  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$  ( Obr. 3 ) (Danilewicz, Seccombe, a Whelan, 2008). Další sloučeniny s více izolovaných fenolových skupin, jako je malvidin, což je hlavní barevný antokyan v červených vínech, para kyselina-kumarová a resveratrol jsou oxidovatelné při vyšších potenciálech (Kilmartinu a kol., 2001).

Volné radikály druhy se vyskytují v různých reakcích v mnoha biologických systémech a procesech zodpovědných za znečišťování potravin. Reaktivní formy kyslíku (ROS) je souhrnný termín používaný k popisu kyslíkových radikálů, jako je peroxidový anion ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ), a její konjugované kyseliny hydroperoxyl ( $\text{HOO}^{\cdot}$ ), hydroxyl ( $\text{HO}^{\cdot}$ ), peroxy ( $\text{ROO}^{\cdot}$ ), alkoxy ( $\text{RO}^{\cdot}$ ) radikály, a některé další neradikály, které jsou buď potenciální oxidační prostředky, nebo mohou být snadno přeměněny na radikály, jako je peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ozon ( $\text{O}_3$ ), kyselina chlorná ( $\text{HClO}$ ), singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ), a lipidové peroxidy ( $\text{LOOH}$ ) (Shchepinov, 2007).

Ve víně ROS mohou být produkovány skrz ionty přechodných kovů [např Fe (II)] v postupné přidávání jednoho elektronu na tripletový kyslík ( $O_2$ ). Počáteční přenos elektronu vede k tvorbě aniontu superoxidového radikálu ( $O_2^{\bullet-}$ ), která při pH vína existuje v protonové formě jako hydroperoxylový radikál ( $HOO^{\bullet}$ ) ( obr. 1 ). Přenos druhého elektronu bude produkovat peroxidový aniont ( $O_2^{2-}$ ), která při pH vína existuje v protonové formě jako peroxidu vodíku ( $H_2O_2$ ) ( Obr. 1 ). Další redukční krok vytvoří dokonce více reaktivní oxidant, hydroxylový radikál ( $HO^{\bullet}$ ) ( obr. 1 ), který může odštěpit atomu vodíku z organických sloučenin, kdy následuje produkce vody, finální produkt redukce kyslíkem (Danilewicz 2003).



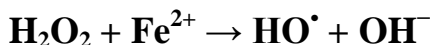
Obr.č.3 Navrhované katalytické působení iontů mědi a železa v oxidaci katecholů vedoucí k produkci chinonů a peroxidu vodíku ( Danilewicz a kol.,2008 ).

Danilewicz (2003) a poté Waterhouse a Laurie (2006) zkoumali navrhované mechanismy reakcí, kterými kyslík a jeho redukční meziprodukty reagují se složkami vína, za přítomnosti iontů přechodných kovů. Autoři dospěli k závěru, že kyslík nereaguje přímo s fenolickými sloučeninami bez přítomnosti iontů přechodných kovů.

Tyto chinony, vytvořené z oxidace polyfenolů, jako primární produkty, jsou nestálé a mohou být podrobeny dalším reakcím. Chinony se mohou spontánně kombinovat s nukleofilními sloučeninami (včetně některých fenolů, thiolů a aminů), vzhledem k jejich vysokému elektrofilnímu charakteru.

Při reakci peroxidu vodíku s železnatými ionty vznikají hydroxylové radikály ( $HO^{\bullet}$ ), což je známo jako Fentonova reakce (Obr.4). Hydroxylový radikál je redukovaný produkt kyslíku, který má schopnost oxidovat téměř jakoukoli organickou molekulu, vyskytující se ve víně (Waterhouse a Laurie 2006). Z důvodů jeho neselektivních vlastností bude reagovat s první druhem na který narazí, v závislosti na její koncentraci

(Danilewicz, 2003), jako je například ethanol, kyselina vinná, glycerol, cukry a organické kyseliny ( Danilewicz, 2003 a Waterhouse a Laurie, 2006).



Obr.č.4 Fentonova reakce

Ortho-dihydroxybenzoové kruhy jsou oxidovány na chinony v postupném přenosu dvou atomů vodíku (Danilewicz, 2003). Za normálních podmínek stavu vína, jsou fenolické oxidační reakce pomalé. Na druhé straně, elektrony jsou rychle převedeny z fenolů do semichinonů při pH 7 (Danilewicz, 2003), takže v alkalickém prostředí víno reaguje mnohem rychleji s kyslíkem než při nižším pH. (Singleton, Trousdale, a Zaya, 1979 ).

#### **4. Hlavní substráty pro enzymatickou oxidaci**

Mezi hlavní substráty využívané oxidativními enzymy jsou převážně flavonoidy a neflavonoidy. Každá z těchto skupin má velké a významné množství fenolických sloučenin s odlišnými chemickými vlastnostmi.

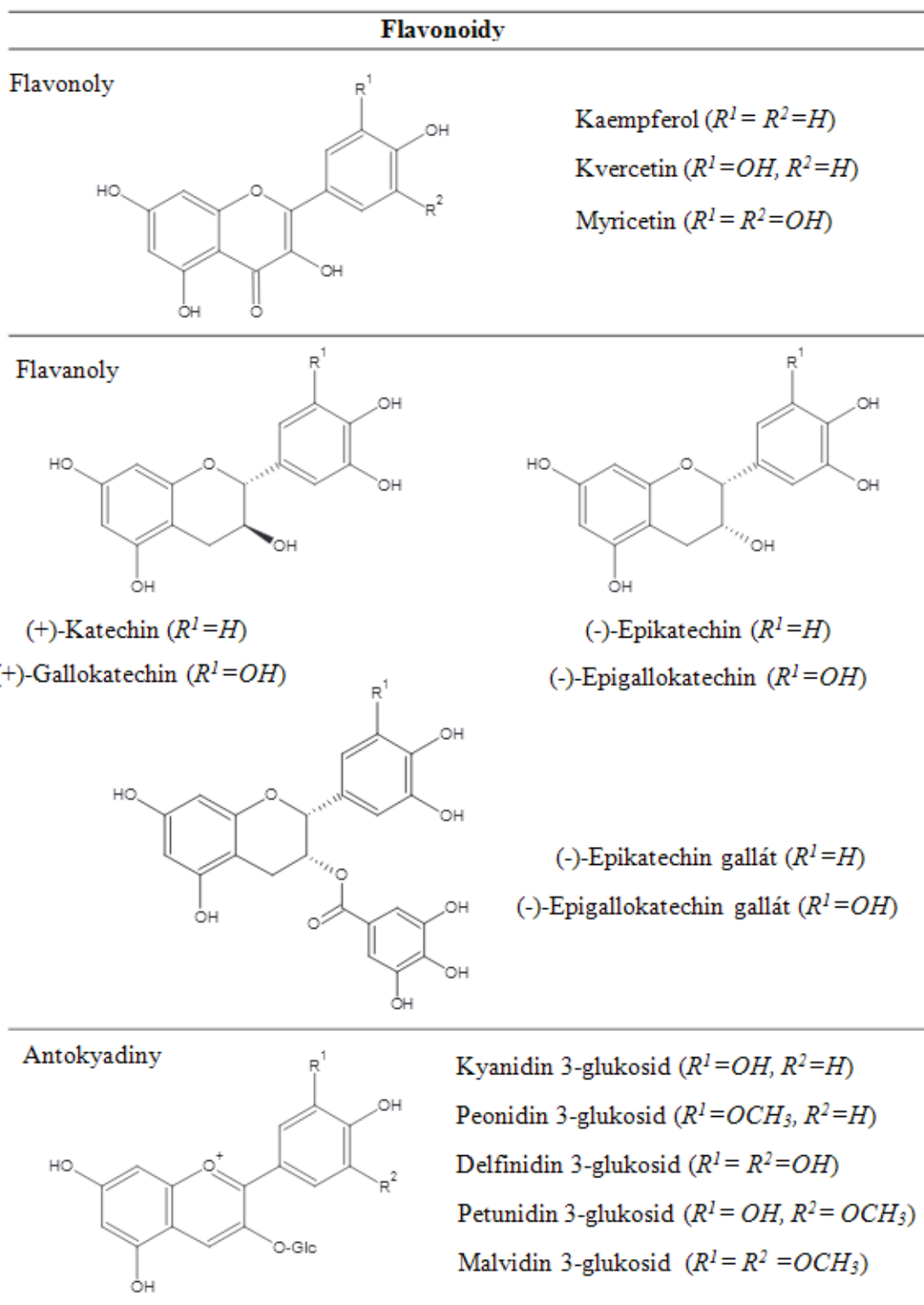
##### **4.1 Flavonoidy**

Flavonoidy se vyznačují C6-C3-C6 kostrou sestávající ze dvou fenolických jader (A a B) spojený pyranovým (obsahující kyslík) jadrem (C). Různé stupně oxidace heterocyklického kruhu (C) a hydroxylace/metoxylace jednoho ze tří jader vede ke vzniku velké skupiny struktur, s rozdíly ve fyzikálně-chemických vlastnostech a stability. Nejběžnější vinné Flavonoidy jsou flavanoly (kaempferol, kvercetin a myristupetin). Jsou to žluté pigmenty s různou intenzitou barev. Jejich strukturu charakterizují dvě benzeové jádra spojená okysličeným heterocyklem (Michlovský, red wine). Další skupinu těchto látek tvoří flavonoly (katechin, Epikatechin a taniny) a antokyany (kyanidin-3-glukosid, peonidin-3-glukosid, delphinidin-3-glukosid, petunidin-3-glukosid a malvidin-3-glukosid- obr.č.5)( Carla Oliveira, 2011).

Koncentrace flavonoidů během zpracování vína závisí na mnoha faktorech. Základem je jejich obsah v bobulích (85 procent všech fenolických látek v červeném víně). V červeném víně dosahuje jejich koncentrace až 1g/l, zatímco v bílých vínech dosahují koncentrace těchto látek do 20 procent – kolem 50 mg/l v závislosti na stupni extrakci, dále kontaktu se slupkou a semeny atd.). Koncentrace flavonoidů ve víně je



silně ovlivněna praktikami vinařství jako jsou lisování a macerace, které ovlivňují stupeň extrakce ze slupek a především semen. Semena jsou bohatá především na flavanoly.



Obr.č.5 Flavonoidy a jejich jednotlivé struktury (Carla Oliveira,2011)

## 4.2 Neflavonoidy

Neflanoidní fenolické sloučeniny ve víně jsou rozděleny **hydroxybenzoové kyseliny** a **kyseliny hydrokskořicové**, těkavé fenoly, a různé sloučeniny (například lignany a kumariny). Ačkoli u nebarevných neflavonoidních složkách je známé, že posilují a stabilizují barvy červených vín intra a inter-molekulárními reakcemi. Mohou mít také vliv na aroma vína (volatelní fenolové kyseliny) a některé z nich např. resveratrol vykazuje silnou biologickou aktivitu.

### 4.2.1 Hydroxybenzové kyseliny

Jsou odvozeny od kyseliny benzoové, kyseliny hydroxybenzoové se vyznačují C6-C1 skeletu (Obr.č.6). Nejběžnější deriváty nalezené ve víně jsou kyselina gallová, kyselina gentisová, p-kyselina hydroxybenzová, kyselina protokatechinová, kyselina syringová, salicylová kyselina a kyselina vanilová. Ve víně mohou být hydroxybenzoové kyseliny nalezeny převážně v jejich volné formě.(M.V. Moreno-Arribas, 2009)

Z hydroxybenzoových kyselin má největší zastoupení kyselina gallová. Nejen že pochází ze samotných hroznů, ale je také tvořen hydrolyzou hydroxylovatelných a kondenzovaných taninů. Hladiny HBA ve víně vykazují velkou variabilitu v závislosti na moštové odrůdě a vegetačních podmínkách. Pozo-Bay Na et al. (2003) uvádějí hodnoty mezi 0,3 a 1,3 mg / l pro kyselinu gallovou ve španělských šumivých vínech z bílých a červených hroznů, kyseliny protocatechinové byly hodnoty mezi 0,5 a 0,93 mg / l, zatímco koncentrace pro kyselinu p-hydroxyskořicovou byly v rozmezí 0-0,22 mg / l. Pena-Neira et al. (2000) detekoval ve víně z La Rioja koncentraci kyseliny gallové až 2,29 mg / l, zatímco Sladkovsky a kol. (2004) uvádějí koncentrace kolem 4,8 mg / l v tawny portském. Někteří autoři uvádějí koncentraci kyseliny gallové až do 41,6 mg / l. Nicméně, ve srovnání se skupinou hydroxyskořicových kyselin je celková koncentrace HBA ve víně poměrně nízká.

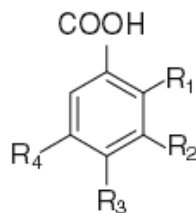
Celkově bylo identifikováno 7 benzoových kyselin (C6-C1). Dvě jsou přítomny jen ve stopových množstvích: kyselina salicylová (ortho-hydroxybenzoová kyselina) a kyselina gentisová (2,5-dihydroxybenzoová kyselina). Kyselina salicylová a její nestálý ester salicylan metylatý jsou molekulami signalizující odpověď na rostlinný patogen.

Kyselina salycilová má protizánětlivé účinky, ale v bobulích je přítomna jen ve stopách (40ug/kg čerstvé váhy bobule, což je zanedbatelné množství).

Kyselina gallová se v bobulích vyskytuje v množství od 2 do 13 mg/kg. Převážně v semenech, kde tvoří estery s katechinem. Kyseliny se liší podle substituce jejich benzeového jádra. V bobulích se vyskytují ve formě glykosidů, z kterých se uvolňují hydrolýzou, a ve formě esterů (gallo- a egallotaniny), z nichž se uvolňují pomocí alkalické hydrolýzy. Převládají volné formy těchto látek, hlavně v červeném víně, díky hydrolýze a tepelnému štěpení složitějších molekul, zvláště antokyanů. (M.V. Moreno-Arribas, 2009)

Nejrozšířenější jsou odvozeniny okyseliny hydroksybenzové. Byly identifikovány v malých množstvích ve volné formě, ale v zásadě jsou to estery kyseliny vinné a glykosidy. Nejčastěji jsou to kyseliny kaftarová, kutarová a fertarová – estery kyseliny vinné a kávové, p-kumarové, ferulové v uvedeném pořadí. V přítomnosti metyl-esterázy se estery rozpadnou na monomery. Také se hydrolyzují během kvašení. V bobulích se nejčastěji vyskytuje kyselina kaftarová (o-difenol), která je pak vysoce oxidovatelnou součástí moštu způsobující jeho hnědnutí. Kyselina skořicová se spojí s monoglykosidy antokyanů a vytvoří acylovatelné antokyany, esterifikací kyseliny kávové a p-kyseliny kumarové s hroznovým cukrem pak tvoří glukosid. V malém množství způsobují produkty okysličených kyselin kaftarové a kutarové žluto-zlaté zbarvení bílých vín.

Navzdory vysokému obsahu okysličených ne flavonoidů v červených vínech, antokyany a prokyanidiny maskují jejich přítomnost. V případě nových (interspecifických) odrůd je kyselina kaftarová převládající fenolovou kyselinou v bobulích. Kyselina gallová rovněž dodává bobulím antiradikálovou aktivitu, ale nejvíce ji zřejmě zajišťuje kyselina kaftarová. Podnož má významný vliv na obsah jednotlivých sloučenin v hroznech, ale vliv roku je výrazně větší. Fenolové kyseliny jdou ve zředěném roztoku alkoholu běžně bezbarvé, ale oxidací mohou zežloutnout. Z organoleptického hlediska jsou bez chuti a zápachu. Jsou prekurzory těkavých vytvořených mikroorganismy (kvasinky rodu *Brettanomyces* a bakterie). Etylfenoly s animálním aromatem a etyl-guajakoly se nalézají v červených vínech. V bílých vínech se nachází vinylyfenoly s aromatem připomínajícím kvašené zelí a vinyly-guajakoly. Tyto sloučeniny vznikají reakcí kyselin p-kumarové a ferulové.



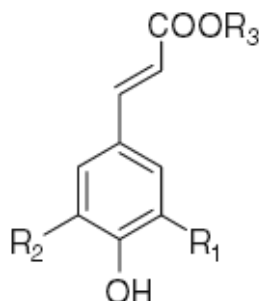
Hydroxybenzoové kyseliny	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	MW
Kyselina gallová	H	OH	OH	OH	170
Kyselina gentisová	OH	H	H	OH	154
Kyselina p-Hydroxybenzoová	H	H	OH	H	138
Kyselina protokatechová	H	OH	OH	H	154
Kyselina salicylová	OH	H	H	H	138
Kyselina syringová	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	198
Kyselina vanilová	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	168

Obr.č 6 Hydroxybenzové kyseliny (M.V. Moreno-Arribas, 2009)

#### 4.2.2 Hydroskořicové kyseliny

Hydroskořicové kyseliny se se vyznačují C6 –C3 kostrou a formálně patří do skupiny fenylypropanoidu. Různé sloučeniny přítomné ve víně jsou především deriváty odvozené od hydroskořicových kyselin – kyselina kávová, kyselina p-kumarová, kyselina nerulová kyselina synapová (obr č.7). Tyto deriváty mohou být přítomny v cis a trans konjugované formě. Trans formy jsou více stabilní a proto i převažují. Ve víně jsou HCA přítomny ve volné formě v nízkých koncentracích, zatímco depsidy formy tj. estery L-(+)- kyseliny vinné převažují. Depsid odvozený od kyseliny kávové. Všudepřítomné chlorgenové kyseliny, estery hydroskořicových kyselin a kyselinu chinovou ve víně nelze nalézt, ale jsou místo nich nahrazeny estery kyseliny vinné. Mezi hydroxyskořicovými kyselinami převládá kyselina kaftarová (až o 50% celkových hydroxyskořicové kyseliny). Dalšími důležitými látkami jsou estery kyseliny vinné - kyselina p-kumarová a kyselina ferulová, a trans p-kumarový glukosid. Koncentrace hladiny derivátů hydroxyskořicových kyselin ve víně závisí na mnoha faktorech, jako jsou odrůdy, růstové podmínky, klima, atd. (M.V. Moreno-Arribas, 2009)

Proto není překvapením, že jsou v různých vínech poměrně velké rozdíly. Obecně platí, že koncentrace těchto sloučenin se pohybuje kolem 100 mg/l. Z toho kyselina p-kumarová se pohybovala v rozmezí okolo 55mg/l a kyselina ferulová se pohybuje kolem 16 mg /l.



Hydroxyskořicové kyseliny	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	MW
Kyselina kávová	OH	H	H	180
Kyselina kaftarová	OH	H	Kyselina vinná	312
p-Kyselina kumarová	H	H	H	164
p-Kyselina kutarová	H	H	Kyselina vinná	296
Kyselina ferulová	OCH <sub>3</sub>	H	H	194
Kyselina Ferturová	OCH <sub>3</sub>	H	Kyselina vinná	326
Kyselina sinapová	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	224

Obr.č.7 Hydroskořicové kyseliny (M.V. Moreno-Arribas, 2009)

#### 4.2.3 Těkave fenoly

Těkavé fenoly mají nejnižší koncentraci mezi fenolickými sloučeninami ve víně. Nicméně, vzhledem k jejich aktivnímu zápachu mají velký vliv na sensorické vlastnosti vína. Pro tvorbu těkavých fenolů mohou být rozlišeny dva způsoby. Jedním z nich je enzymatická tvorba z prekurzorů přítomných ve víně a druhý původ je ze dřeva, během zrání v barelu. Mezi těkavými fenoly, hrají nejdůležitější roli vinyl a ethyl fenoly. Vznikají z dekarboxylaci hydroxyskořicových kyselinů, tyto sloučeniny jsou potom zodpovědné za pachutě vín. Vinylfenoly mají nepříjemný zápach. S prahovými hodnotami v rozmezí od 420 g / l v poměru 10/1 směsi 4-vinlyfenolu a 4-vinylguaiakolu v bílém víně a 720 g / l v poměru 1/1 směsi ethyl-fenolů v červeném víně. Tyto

sloučeniny mohou víno velmi snadno zkazit. Jak uvádí Chatonnet et al. (1989), kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* mohou dekarboxylovat jen kyselinu kumarovou a ferulovou. Daleko účinnější kvasinky zodpovědné za nepříjemné pachy vín s těkavými fenoly jsou *Brettanomyces/Dekkerra*, typ, který může produkovat vinyl a ethyl fenoly hydroxylových skořicových kyselin. Přehled na toto téma poskytuje Ribéreau-Gayon et al. (2000). Dalším zdrojem těkavých fenolů je dubové dřevo. (M.V. Moreno-Arribas, 2009)

### **4.3 Reakce hydroxyskořicových kyselin s antokyanů**

Hydroxyskořicové kyseliny se účastní četných reakcí, které se vyskytují v průběhu výroby zrání vína. Jsou to důležité sloučeniny v oxidačních procesech vína. Při skladování kyslík reaguje přes vázanou oxidaci s vicinálními di- a trihydroxyfenoly, jako je kyselina kávová, za vzniku odpovídajících chinonů ( Singleton 1974)

Následná reakce může vyústit k oxidaci etanolu na acetaldehyd, u něhož bylo prokázáno, že se účastní kondenzačních reakcí mezi vinnými fenoly, jako jsou například antokyaniny a flavan-3-oly, které tvoří velké množství nových, částečně ethyl-vázaných pigmentů. Barva červeného vína je také silně ovlivněna přítomností hydroxyskořicových kyselin. Hrají důležitou roli v kopigmentaci, což je interakce s prokyanidiny (např. katechiny, tzv. kopigmenty) tím vzniká narevný komplex, který znázorňuje zintenzivnění barvy antokyanových roztoků přítomností dalších fenolických látek. (M.V. Moreno-Arribas, 2009)

## **5. Enzymy obecně**

Enzymy jsou jednoduché nebo složité bílkoviny s katalytickou aktivitou. Určují povahu rychlost chemických reakcí a řídí většinu biochemických procesů v těle všech živých organismů (Michlovský, 2014).

Tyto biologické katalyzátory jsou většinou vodorozpustné, ale srážející se s etanolem. Jejich stabilita je v roztoku poměrně nízká. Jsou citlivé na chlad, ale taky na teploty nad 50<sup>0</sup>C. Uvádí se, že všechny izolované enzymy byly identifikovány jako bílkoviny, a to buď jako proteiny nebo jako proteidy. Podle dnešní představy je aktivní enzym složitý útvar, který se skládá apoenzymu a koenzymu. Oddělí-li se apoenzym od koenzymu, dochází ke ztrátě biologické aktivity enzymu. Ferenčík uvádí, že enzymová

reakce probíhá v několika etapách. Nejprve je to reakce, při které se vytvoří komplex enzym-substrát, dále reakce, při níž probíhá aktivace komplexu enzym-substrát a následuje chemická přeměna substrátu, kdy vzniká komplex enzym-produkt. Na konci reakce se odděluje enzym od reakčního produktu. Aktivitu enzymu ovlivňují i fyzikální a chemické činitele. Důležitou úlohu v enzymových reakcích má teplota. Při 0<sup>o</sup> je účinek enzymu nepatrný. Za vysokých teplot od 50 do 80<sup>o</sup>C se většina enzymů inaktivuje. Pro většinu enzymů je optimální teplota průběhu enzymových reakcí od 25 do 40<sup>o</sup>C.

Na průběh a rychlost enzymové reakce má značný vliv koncentrace vodíkových iontů neboli pH, která je pro jednotlivé enzymy charakteristická. Optimální hodnota znamená pH znamená, že při dané koncentraci vodíkových iontů jsou funkční skupiny aktivního centra enzymu nebo substrátu v nevhodnějším disociačním stavu k vzájemné vazbě. Důležitou úlohu v enzymových reakcích mají aktivátory, které zvyšují účinek enzymů. Stimulačně působí nejvíce kationty Fe<sup>2+</sup> a Cu (Farkas, 1980).

Enzym se skládá ze dvou částí:

Apoenzym čistě bílkovinného charakteru a se složitou strukturou, udává specifitu enzymu.

Koenzym, jednodušší struktury, je nepostradatelný při katalytické aktivitě enzymu a vyměňuje např. chemické skupiny se substrátem.

Klasifikace enzymu je sice přesná, ale složitá. Enzym může být označován:

- a) Doporučeným podstatným jménem
- b) Systematickým jménem
- c) Pořadovým číslem složeným ze čtyř číslic

## **6. Oxidativní enzymy v hroznech s jejich klasifikací**

Enzymatická oxidace fenolů, a to zejména v přítomnosti atmosférického kyslíku a za přítomnosti polyfenoloxidas (PPO), probíhá v časných stádiích zpracování hroznů a je dobře známo, že je příčinou zhnědnutí i v potravinách (Wang, 1990). V intaktních buňkách čerstvého ovoce se fenoly nachází převážně ve vakuolách a oxidoreduktázy v cytoplazmě. Z toho důvodu se při poranění buňky na vzduchu spustí enzymatické oxidace způsobující zhnědnutí (Wang, 1990).

Oxidativní hnědnutí při výrobě vína je dobře známý jev, který může nastat v různých fázích procesu vinifikace. Jak již bylo řečeno, enzymatická oxidace fenolických látek probíhá v přítomnosti kyslíku během předfermentačních operací, v důsledku působení hroznových oxidativních enzymů. Hlavní oxidoreduktázy zodpovědné za oxidaci moštu při zpracování hroznů jsou polyfenoloxidázy (PPO) a peroxidázy (POD) (Li et al., 2005). Oxidativní zhnědnutí způsobené POD se zdá být nevýznamným, ačkoli někteří výzkumníci zjistili, že při vzájemném působení s PPO se zvyšovala degradaci fenolů (Robards et al., 1999).

Podle výboru názvoslovím Mezinárodní unie biochemie a molekulární biologie (NC-IUBMB), jsou tyto enzymy součástí třídy E.C.1- oxidoreduktázy.

EC 1.10.3 je podtřída, která zahrnuje enzymy, které používají katecholy nebo příbuzné sloučeniny jako donory elektronů a kyslík jako akceptor elektronů, což vede k oxidaci donoru za vzniku vody. Do této kategorie patří katechol oxidáza (EC 1.10.3.1), lakáza (EC 1.10.3.2) a ortho -aminofenol oxidáza (ES 1.10.3.4).

Katechol oxidáza je také známá jako difenoloxidáza, fenoloxidáza, polyfenoloxidáza a tyrosináza, nicméně, lakáza je také známá jako para-difenoloxidáza. Oxidativní enzymy této skupiny více či méně významné pro oxidaci moštu patří tedy tyrosináza, lakáza, lipooxygenáza a peroxidáza.(Carla Oliveira,2011)

## **6.1 Tyrosináza**

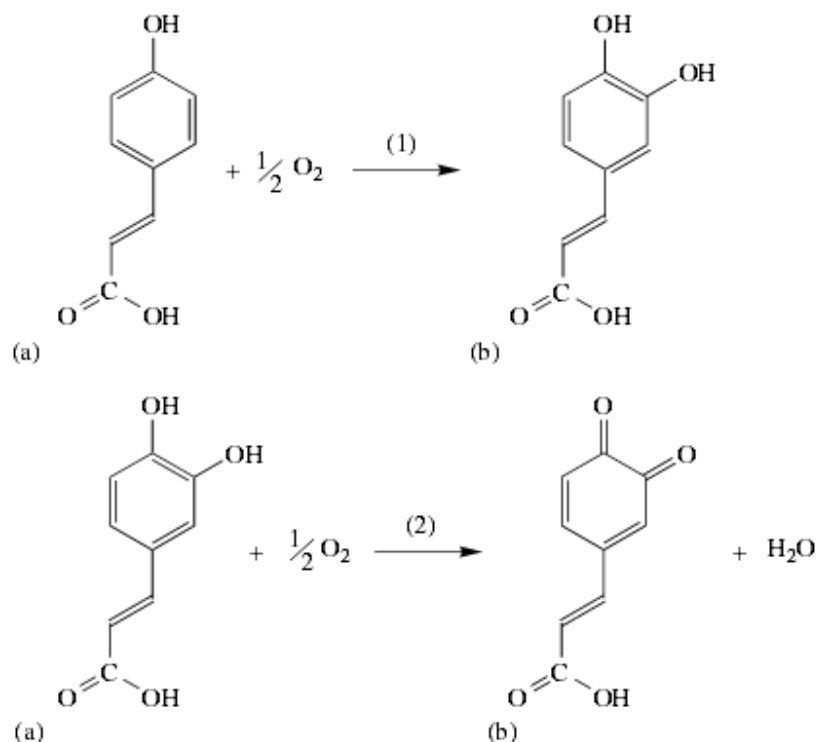
Tyrosináza je přirozeně produkována v hroznových bobulích a může katalyzovat oxidaci monofenolů a katecholů.(wang,1990)

Oxidační enzym tyrosináza má dva druhy aktivity: aktivita fenol ortho-hydroxyláza (kresoláza) , při kterém je monophenol přeměněn na katechol prostřednictvím kyslíku, a aktivita katecholáza, kdy je katechol oxidován na hnědý pigment melanin (Sánchez-Ferrer, Rodríguez-López, García-Cánovas, a García-Carmona, 1995).

Tyrosináza má jako substrát v moštu téměř výlučně kyselinu skořicovou a její estery s kyselinou vinnou tzv. depsidy (kyselina kaftarová a kyselina kutarová). Transformuje kyselinu kaftarovou na její příslušný chinon. Vlivem enzymu kresolasové aktivity (monofenolmonoxynáza) kyselina kutarová dává vznik stejnému chinonu jako kyselina kaftarová. Tyto oxidační reakce jsou velmi rychlé, přinejmenším začátkem kontaktu moštu se vzduchem může rychlost spotřeby kyslíku překročit 2 mg/l za minutu, zatímco



ve víně je řádově mezi 1 až 2 mg/l za den. Z toho vyplývá, že v praxi vinifikace bílých vín není možné vyloučit určitou spotřebu kyslíku moštem před jeho ochrannou oxidem siřičitým. Pokles rychlosti spotřeby kyslíku v moštu během jeho postupné saturace vyplývá z vyčerpání substrátu, kyseliny kaftarové, mnohem více než z inhibičního působení vzniklých produktů oxidace. Dodání kyseliny kaftarové obnoví rychlost původní spotřeby (Michlovský,2014)



Obr.č 8. Mechanismus účinku hroznové tyrosinasy na hydroksoičicové kyseliny (Mayer a Harel, 1979). (1) aktivita kreoláza (a: kyselina kumarová, b: kyselina kávová) (2) aktivita katecholáza: (a) kyselina kávová; (b) chinon (Pascal Ribereau, 2006)

## 6.2 Lakáza

Lakáza je enzym s aktivním měďnatým centrem, který produkuje výhradně *Bortritis cinerea*. Lakáza je produkovaná plísní a je schopna oxidovat široké spektrum substrátů, zejména 1,2- a 1,4-dyhydroxibenzenu (Wang,1980).

Aktivita tohoto enzymu je 30 krát vyšší než u tyrosinasy. Navíc je stabilní při obvyklém pH a není inhibována SO<sub>2</sub>. Také může reagovat s různými fenolickými substráty, stejně jako s jinými třídami chemických sloučenin, včetně chinon-glutathionu komplexu (Salgues et al., 1986). Vážnější oxidace se proto očekává v moštech

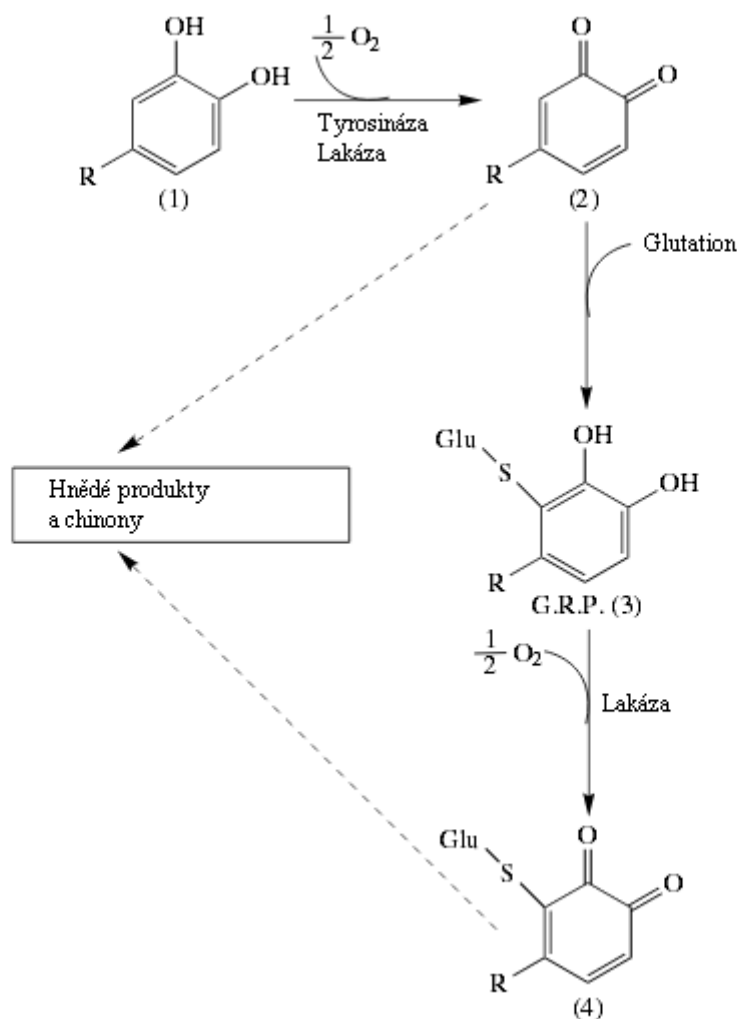
vyrobených z hroznů infikovaných více či méně plísní *Bortritis*. Ve vinařství mohou být přijata různé typy strategií, jak omezit oxidační jevy.

Lakáza se vyznačuje destrukční aktivitou polyfenolů, včetně antokyanů. Toto působení je názorné při silné enzymatické aktivitě: během několika hodin je čerstvý červený mošt přeměněný na nahnědlý odvar, „kaštanový bujón“ podle obvyklého vyjadřování. Na rozdíl od tyrozinázy dokáže oxidovat daleko větší spektrum substrátů, je daleko odolnější vůči oxidu siřičitému, její působení je rovněž rychlé, ale trvá mnohem déle (Michlovský, 2014)

Již malé procento *bortritidou* postižené hrozny vážně narušuje aromatickou kvalitu bílých vín. Způsobuje větší nestálost fermentačních vůní. Tyto důsledky plísně šedé jsou na aroma bílých vín obávanější než vlastní oxidační zákal. Meně intenzivní působení některých mladých a trochu drsných tříslovin. Delší působení během měsíců nebo let vyzrávání v tancích nebo baricích nebo i v láhvích způsobuje zrychlené stárnutí, vyčerpání nebo vysýchání příjemných vín v jejich první stadiích vývoje. Znalost a zvládnutí aktivisty lakázy ve vínech platí pro všechny vinifikátory. (Michlovsky, 2014)

Laboratorní stanovení stop aktivity lakázy je součástí všech základních kontrol. Význam lakázy vedl upřesnění jejího stanovení na hroznech a moštích ještě před bonifikací. Lakáza se stanovuje i pro její vlastní roli, i jako celkový markér *BORTRITIS*, jako ukazatel celkových důsledků hniloby. Existují přístroje používané pro automatické stanovení už při příjmu hroznů ke zpracování ve sklepě. Jsou založeny na dvou principech – buď na spotřebě kyslíku v standardizovaných podmínkách po inhibici jiných oxidativních enzymů jako je tyrozináza (systém Salgues-Oliveri, přístroj od Société Seres), nebo stanovením specifické barevné reakce mezi lakázou a syringaldazinem (systém Grassin-Dubourdieu, přístroj od Societé Bio-Serae). Jsou rovněž sady vizuálního pozorování aktivity lakázy (*Bortrytest*, *Botrykit*), které jsou pohodlnější, ale méně přesné než kolometrické stanovení v laboratoři (Blouin). Ve všech případech kvalita výsledku, tj. shoda mezi měřením a souborem analyzované partie, závisí silně na kvalitě vzorkování: je nezbytné vykonat několik odběrů (3 až 10) z jedné nádoby. Je třeba podotknout, že podstata lakázy se nachází ve slupce, zatímco obvyklé vzorky moštu dostáváme např. do refraktometru, jsou téměř výlučně tvořeny z dužniny, kde je lakázy nejméně. Tato operace vzorkování slupek je zdlouhavá a namáhavá, je však nezbytná pro přesné využití analytického přístroje. Správné

stanovení aktivity lakázy nestačí přeně předložit závažnost škod vyplívajících z botrytického postižení. Během let bylo zjištěno, že některé partie hroznů, na první pohled téměř zdravé, zatímco jiné podle vzhledu velmi poškozené hnilobou vykazovaly nízkou aktivitu lakázy. Lakáza se vytváří ve slupce velmi rychle, ještě před viditelnými poškozeními, po čase se zmírňuje, zatímco se další škody způsobované botrytidou akumulují v hroznech. Tyto rozdíly mezi vzhledem, stanovením a skutečným poškozením jsou zdrojem nevyčerpatelných neplodných diskuzí. Lakáza je markérem aktivity Botrytis v daném momentu a nestačí charakterizovat souhrn hnilobných procesů. Její stanovení zůstává přesným operačním nástrojem ke třídění sklizených hroznů ma partie podle zdravotního stavu“ dokonalý, průměrný, nedostatečný a stává se tak předmětem upravených enologických postupů. Potřebné hodnoty pro stejnou enologickou kvalitu se musí měnit podle odrůdy, ročníku, typu vína. Výsledky se vyjadřují v jednotkách lakázy. Mošty ze zdravých bobulí zřetelně neobsahují lakázu. Ta pochází z nahnílých bobulí a může nevyskytovat v koncentraci od 1 až do několika desítek jednotek v 1 ml, a to podle stadia rozvoje houby, odrůdy a klimatických podmínek, které ovlivňují její obsah v bobuli. Takže před objevením se konidioforů Botrytis vykazují nahnílé bobule nízkou lakázní aktivitu (1 až 2 jednotky\_ml), tato aktivita výrazně stoupá se sporulací (na 15 až 20 jednotek\_ml) a pokračuje dále narůstáním koncentrací během vadnutí bobule (tab. 3). Je vždy obtížné určit univerzální práh enologické tolerance na závadnost sklizených hroznů, závisí na vyžadované úrovni kvality nebo dokonalosti vína.(Michlovský,2014)



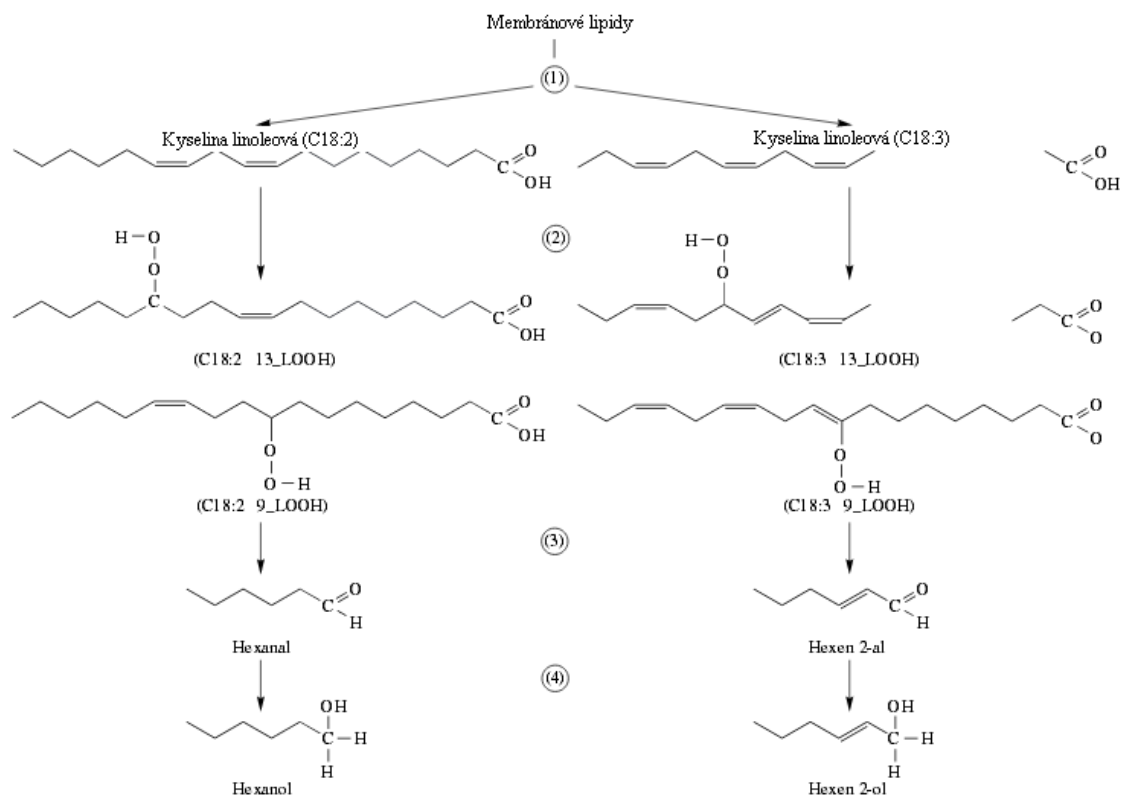
Obr.č. 9 Oxidační mechanismus zdravého hroznového moštu tyrosinázou a napadeného hroznového moštu plísní šedou lakázou (Pascal Ribereau-Gayon, 2006)

### 6.3 Lipooxygenáza

Pokud se drtí rostlinná tkáň (především listů, ale také ovoce), jsou produkovány pachy typu zelených listů či posekané trávy. Tento jev byl v hroznech prokázán Rappem et. Al. (1979).

Do této reakce jsou postupně zapojeny čtyři enzymatické aktivity. Za prvé, acylhydroláza uvolňuje mastné kyseliny z membránových lipidů. Dále lipooxygenasa katalyzuje fixaci kyslíku na tyto  $C_{18}$  nenasycené mastné kyseliny. Tyto enzymy tvoří přednostně hydroperoxy v  $C_{13}$  formě z linolových a linoleových kyselin. Získané peroxy se pak štěpí do  $C_6$  aldehydů. Některé z nich jsou redukovány na jejich odpovídající alkoholy alkoholovou dehydrogenásou hroznů. Tyto alkoholy jsou odpovědné za jejich odpovídající pachy. Vzhledem tomu, že enzymy jsou napojeny na

membránové frakce, koncentrace aldehydů je přímo úměrná intenzitě pevných látek z macerace. Narušení buněčné struktury hroznu během předfermentačních operací je doprovázeno jinou, mnohem více aktivnější enzymatickou oxidací. Rychlost spotřeby kyslíku se pohybuje od 0,5 do 5 mg /l/ min, v závislosti na původu a vlastnostech moštu. Tato změna je způsobena oxidací fenolických sloučenin. (Pascal Ribereau-Gayon 2006)



Obr.č.10 Enzymatický mechanismus tvorby aldehydů a C6 alkoholů, odpovědné za travnaté chuti (Crouzet,1986). (1) [acyl] hydroláza; (2) lipoxygenáza v přítomnosti kyslíku; (3) štěpící enzym peroxid; (4) alkoholdehydrogenáza (Pascal Ribereau-Gayon 2006)

## 7. Mechanismus aktivity oxidativních enzymů

V hroznovém moště, enzymatické hnědnutí do značné míry koreluje s obsahem hydroskořicových kyselin, převážně s kyselinou kaftarovou a kutarovou a je podporováno flavan-3-oly.(Wang,1990)

Při drcení hroznů se okamžitě uvolní polyfenoloxidázy (PPO) a rychle oxidují hydroskořicové kyseliny na benzochinony. Mezitím se benzochinony produkované enzymatickou činností účastní dalších reakcí v závislosti na jejich elektronické afinitě a redukčních vlastnostech. Právě oxidanty, chinony, můžou oxidovat látky, které mají nižší potenciál (polyfenoly, kyselina askorbová, SO<sub>2</sub>). Chinon je pak zpět redukován na jeho původní katechol. Jako elektrofil, chinony můžou také reagovat s nukleofily, jako jsou amino deriváty (Kutyrev a Moskva, 1991). Rychlost spotřeby kyslíku se pohybuje od 0.5 do 5 mg /l/ min, v závislosti na původu moštu. Tato změna je z největší části způsobena oxidací fenolových sloučenin (Pascal Ribereau-Gayon, 2006).

Při oxidaci moštu je počáteční spotřeba kyslíku orto - dyhydroxybenzenu zpomalena přidáním thiolů, jako je cystein (Cys), nebo glutation (GSH).(Carla Oliveira, 2011).

Glutation má merkato skupinu -SH s nukleofilním centrem a volným elektronovým párem. Na této merkapto skupině se vytvoří vazba s elektrofilním jádrem chinonu. To vede k regeneraci vicinálního (sousedského) hydroxy jádra kyseliny kávové. Má vedle sebe opět dvě -OH skupiny. Tak vznikne produkt (GRP), který již není substrátem pro tyrozinázu. Nicméně lakáza oxiduje daleko větší spektrum substrátů. Může dále oxidovat produkt (GRP) obr.4. Je-li k dispozici ještě další množství glutationu, vede tato oxidace k vytvoření druhého produktu GRP<sub>2</sub>. Vyčerpání glutationu a dalších nukleofilů vede k hnědnutí. Poměr glutationu ke kyselině kávové by mohl být ukazatelem zvýšené náchylnosti určitého kultivaru k oxidaci. Pohybuje se v rozmezí od 1.3 do 12.7 v bobulích a od 0.6 do 10.5 v moštu (WJ. du Toit,2006).

Mošt může být také rozdělen do tří skupin podle obsahu hydroskořicových kyselin: Poměr hydroskořicových kyselin ke glutationu je od 0,9 do 2,2, což vede k nepatrným změnám barvy v důsledku rychlému vytvoření GRP a v důsledku vysoké koncentrace glutationu. Poměr hydroskořicových kyselin ke glutationu je od 1.1 do 3.6, což vede ke středně zbarvenému moštu. GRP je vytvořen s kyselinou kaftarové. GRP-o-chinon bude dále pokračovat v reakcích, jakmile dojde k depleci glutationu. : Poměr hydroskořicových kyselin ke glutationu je od 3.8 do 6, což vede k tmavě zbarveným

moštům, z důvodů deplece glutationu a vysoké koncentraci o-chinonů kyseliny kaftarové (WJ. du Toit,2006).

Příslušné proporce glutationu a hydroskořicových kyselin se jeví jako ústřední problém enzymatického hnědnutí. Stanovení hydroskořicových kyselin (kaftarové a kutarové), GRP a jejich chinonů při oxidaci série bílých moštů různých odrůd, spojené s analýzou barvy oxidovaných moštů umožnilo odlišit různé třídy moštů podle molárního poměru hydroskořicových kyselin ke glutationu (AH/GSH):

a) Mošty velmi málo citlivé k hnědnutí ( $AH/GSH < 1$ ), kdy se hydroskořicové kyseliny rychle oxidují, zatímco GRP se akumuluje v prostředí a proto je spotřeba kyslíku nízká a barva se prakticky nevyvíjí.

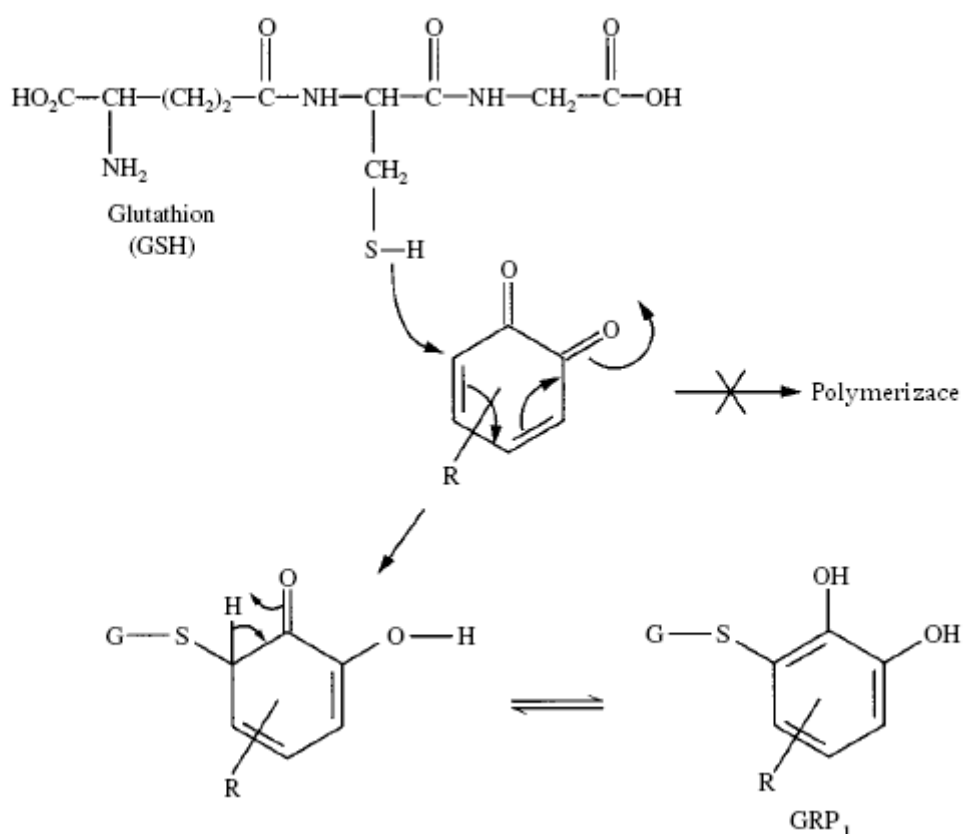
b) Mošty více citlivé k hnědnutí ( $1 < AH/GSH < 3$ ), nebo velmi citlivé k hnědnutí ( $AH/GSH > 3$ ), kde GRP dosahuje po několika minutách oxidace maximum, potom rychle klesá a nastává z chinonů oxidační reakcí regenerace původního substrátu, po které okamžitě následuje nová oxidace, projevující se zvýšenou spotřebou kyslíku. V tomto případě pouze první etapa enzymatické oxidace spotřebuje kyslík, takže tato spotřeba závisí jak na koncentraci substrátu PPO a počtu recyklací v moštu, tj. od množství molekul oxidovaných sdruženou oxidací. Tato schopnost oxidovat může být stanovena pouze přesnou spotřebou kyslíku moštem v kontrolovaných podmínkách, ale rovněž podle vývoje hydroskořicových kyselin, GRP a jejich chinonů během této oxidace (Michlovský,2014)

## 7.1 Glutathion

Glutathion je důležitým sloučeninou v moštu. Glutathion je tripeptid skládající se ze tří aminokyselin (cystein, kyselina glutamová, glycin). Jeho cysteinový zbytek reaguje částečně s chinony vyplývající z oxidace fenolů. Nový derivát (GRP) se oxiduje jen v přítomnosti lákazy produkované houbou Botrytis, zatímco hroznová tyrosináza tuto vlastnost nemá. Nedokáže již dále oxidovat tyto nově vzniklé produkty.

Jako cystein, glutathion obsahuje rozhodující thiol (-SH) skupinu, která z něj činí účinný antioxidant. Prakticky neexistují žádné živé organismy na naší planetě-živočišné nebo rostliny, jejichž buňky neobsahují nějaké množství glutationu. Vědci spekulovali, že glutathionu byl nezbytný pro samotný vývoj života na Zemi. Glutathionu má mnoho rolí; V žádném případě nefunguje jako samostatná jednotka. Je

to koenzym v různých enzymatických reakcích. Nejdůležitější z nich jsou redoxní reakce, ve kterých seskupení na thiol cysteinové části buněčných membrán chrání proti peroxidaci; a konjugační reakce, ve které glutathion (především v játrech), se váže s toxickými chemikáliemi, aby je detoxifikovaly. Glutathion je také důležitý při tvorbě červených a bílých krvinek a tím celého imunitního systému. klinické využití glutathionu zahrnuje dále prevenci toxicity kyslíku v hyperbarické oxygenoterapie, zpracování olova a otravy z jiných těžkých kovů, snížení toxicity chemoterapie a ozařování v léčbě rakoviny a zvrát šedého zákalu a tak není je jasné, že má velkou funkci i v moštu. (Http: // www. Dcnutrition com / aminokyseliny /.)



Obr.č 12 Struktura glutathionu a jeho reakce s chinony vyrobené oxidací fenolů

## 7.2 Chinon vzniklý z kyseliny kaftarové a jeho možné vlastnosti

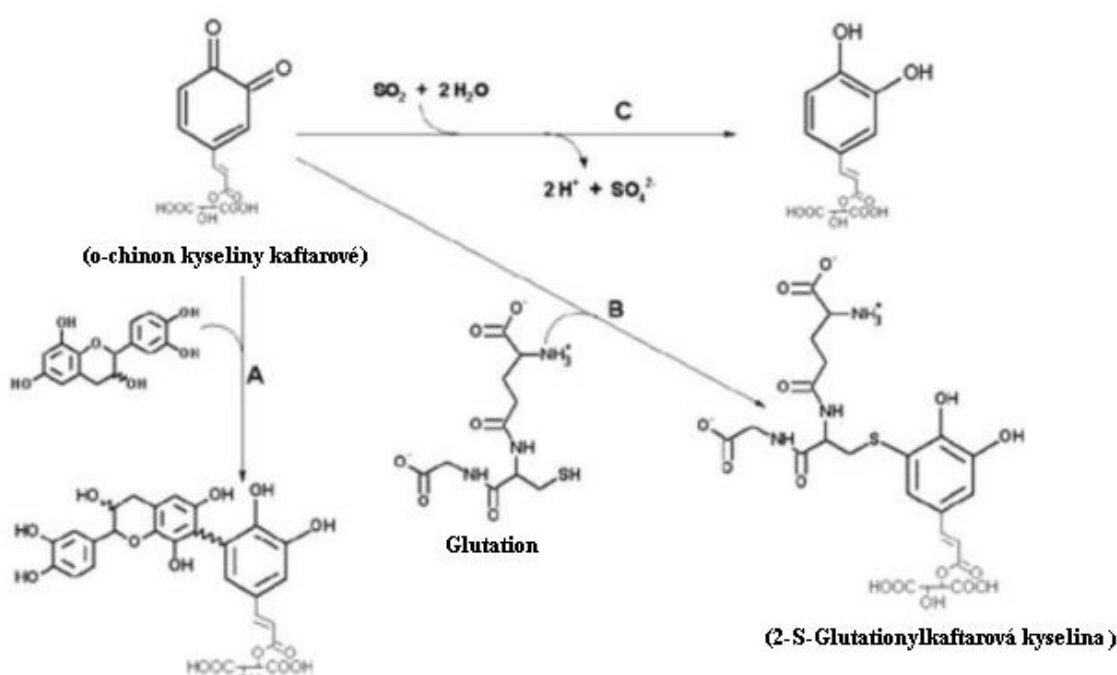
a) Může se vázat s „chininovými pastmi“ moštu a zejména s glutathionem – velmi reduktivním tripeptidem který nese skupinu – SH a jehož některé odrůdy můžou obsahovat až 100mg/kg. Získaným produktem je kyselina S-glutathionyl-2-kaftarová,



původně nazývaná GRP – grape reaction produkt (Cheynier a kol., 1986). Tato oxidoredukční reakce regeneruje funkci o-difenylu, tyrozináza je vůči tomuto derivátu glutationu neaktivní, ale ten může být oxidován lakázou. Chinon kyseliny kaftarové se může vázat i s jinými reduktory moštu, jako je kyselina askorbová, zdvojená oxidace regeneruje kyselinu kaftarovou. Stejně jako jsou zvýšené koncentrace glutationu (GSH) a kyseliny askorbové, spotřeba kyslíku moštem nezpůsobuje akumulaci chinonů, ani hnědnutí moštu

b) Chinon kyseliny kaftarové může též vstoupit do zdvojených oxidací s flavonoidy stejně jako s GRP, vznikají chinony flavonoidů a chinony GRP. Chinon se zase váže s glutationem a vzniká kyselina di-S-glutationyl kaftarová neboli GRP2.

c) Chinon kyseliny kaftarové je posléze schopný kondenzovat se s o-difenoly, především s vlastní kyselinou kaftarovou. Barva a nerozpustnost vzniklých produktů se zvyšují spolu se stupněm kondenzace. Chinony flavanolů vstupují též do kondenzačních reakcí, které vyústí v produkty intenzivně zbarvené, později nerozpustné (Pascal Ribereau-Gayon, 2006).



Obr.č.13 Kondenzační reakce oxidované kyseliny kaftarové (Vinařský obzor,2007/6)

## 8. Možné ochrany moštů před oxidací

### 8.1 Oxid siřičitý

Oxid siřičitý ( $\text{SO}_2$ ) je široce používán od lisování k plnění do lahví, a to zejména u bílých vín, za účelem ochrany moštu a vína. Antimikrobiální a antioxidační aktivity jsou dvě nejdůležitější vlastnosti  $\text{SO}_2$ . Chrání vína proti zhnědnutí a reguluje růst škodlivých kvasinek a bakterií ve víně.  $\text{SO}_2$  mají také možnost podílet se na přídavných reakcích s karbonylovými sloučeninami za vzniku nevolatilních bisulfitových aduktů, a tím zabráni nepříjemným sensorickým vlastnostem. Koncentrace přidané  $\text{SO}_2$  do vína se obvykle pohybuje v rozmezí od 50 do 200 mg / l. Ve víně, existuje rovnováha mezi molekulární a iontovou formou oxidu siřičitého. Při pH vína, 94 až 99% existuje v iontové formě jako hydrogensiřičitanem  $\text{HSO}_3^-$  - a tak pouze malá část je přítomna jako volný  $\text{SO}_2$  (Carla Oliveira, 2011)

Síření moštů je první nejdůležitější a nejúčinnější způsob ochrany moštů proti oxidaci. Abychme zničily aktivitu tyrozinázy, je nutné dodat do moštu 50 mg / l oxidu siřičitého. V případě, že jsou hrozny zdravé, zablokujem touto dávkou všechny enzymatické oxidační mechanismy. Vyšší dávkou se k inaktivaci tyrosinázy síří jen přepadě velmi zbarveného moštu z lisu, který obsahuje chinony (Pascal Ribereau-Gayon, 2006)

Oxid siřičitý je nutné aplikovat jednou jedinou dávkou a co možná nejhomogenněji. Je nutné vyvarovat se menší dávce než 50 mg/l, protože oxidační jevy a hnědnutí moštu se potom jen odkládají, mošt potom spotřebuje veškerý kyslík, který obsahuje. Nejhorší možnou metodou je postupné přidávání malých dávek  $\text{SO}_2$ . Celkové množství kyslíku spotřebovaného v těchto podmínkách moštem vystaveným působení vzduch je potom vyšší než u nazasířeného moštu a finální zbarvení je prakticky stejné jako bez zasíření. Síření hroznů podporuje extrakci fenolových sloučenin ze slupek (Pascal Ribereau-Gayon, 2006).

### 8.2 Kyselina askorbová

Kyselina askorbová (vitamin C) a její optický izomer, kyselina erythorbová byla původně alternativou k siřičitanům. Byla široce používána jako antioxidant při výrobě zvláště bílého vína, především pro její chemické vlastnosti (redukční charakter a kapacitu zachycující kyslík). Podporou jejího používání bylo také její schválení pro

použití výroby vína (Marks, 1990 ). Nicméně, mnoho studií prokázalo, že kyselina askorbová může hrát spíše prooxidační než antioxidantní roli, a to v závislosti na její koncentraci ve víně ( Bradshaw a kol.,2003). Mnoho výsledků nedávných výzkumů v modelových systémech bílých vín ukazovalo, že v případě použití kyseliny askorbové v kombinaci s SO<sub>2</sub> může způsobit zrychlenou spotřebu SO<sub>2</sub> a tím urychlit vznik žlutých pigmentů (Bradshaw a kol.,2004).

Navíc,kyselina askorbová může mít vedle svých silných redukčních vlastností zároveň i silný oxidační účinek. Rodopulo a Meržanjan uvádějí, že kyselina askorbová se může úspěšně požit ve vínech, které se už nebudou provzdušňovat, jinak vzniká v její přítomnosti ve víně silná oxidace. Kyselina askorbová se dehydrogenuje, dává dva atomy vodíku a redukuje chinony. Vlivem askorbátoxidoreduktasy enzymovou oxidací kyseliny askorbové vzniká vzniká kyselina dehydroaskorbová a voda. Naproti tomu při neenzymové oxidaci se vytváří kyselina monodehydroaskorbová a peroxid vodíku, který je schopen při aerobních podmínkách oxidovat i ty složky vína, které se kyslíkem neoxidují. Proto se kyselina askorbová nemá přidávat do vína při současném síření v aerobních podmínkách. Může nastat i rozklad kyseliny askorbové, která potom ztratí svoje biologické a redukující vlastnosti. Kielhofer a Wurdig uvádějí, že kyselina askorbová se oxiduje vzdušným kyslíkem za vzniku peroxidu vodíku a za přítomnosti iontů železa intenzivně oxiduje kyselinu siřičitou. Podle jejich údajů klesl obsah kyseliny siřičité ve víně ze 128 na 106 mg/l, v přítomnosti kyseliny askorbové až na 28 mg/l. Ukázalo se, že kyselina askorbová se může s výhodou používat pouze v anaerobních podmínkách bez přístupu vzduchu při lahvování vína. V současné době již není použití kyseliny askorbové při výrobě vína rozšířené a dokonce ve francii není povolené (Farkas, 1980)

### **8.3 Chlazení moštů, které snižuje rychlost oxidačních reakcí**

Lisování celých hroznů pod 0 C v procesech kryoextrakce výrazně omezuje oxidační jevy. Nárůst znakků ovocitosti u suchých bílých vín touto metodou v porovnání s lisováním při okolní teplotě naznačuje nejen významnější uvolňování aromatických složek a jejich prekurzorů v důsledku zmrazování a rozmrazování slupek, ale provází také omezení oxidativních jevů během lisování při teplotě blízké nule. Odkalování omezuje oxidázni aktivity v moštu, ale nestačí zabránit hnědnutí moštu. V čerstvém před kyslíkem nechráněném moštu zůstává stále dost aktivity rozpuštěné tyrosinázy, a

tak rychle hnědne. Odkalování je naopak prostředkem pro odstranění produktů oxidace, zejména kondenzovaných forem flavonoidů vznikajících během oxidací. Ohřev moštu teoreticky umožňuje destrukci oxidáz, ale musí nastoupit rychle po vylisování vzestup teploty by měl být co nejrychlejší. V praxi se však málo používá (Pascal Ribereau-Gayon, 2006)

#### **8.4 Ohřev moštů na teplotu 60<sup>0</sup>C po dobu několika minut**

Zahřívání rmutu před lisováním. Ohřev může částečně nahradit působení oxidu siřičitého. Zahříváním rmutu se dosáhne inaktivace oxidačních enzymů, dále snížení počtu kvasinek a bakterií a vedle toho částečného vyluhování barviv. Tento způsob umožňuje snížit množství používaného oxidu siřičitého. Nevýhodou jsou vysoké náklady a to, že zahříváním může být ovlivněna chuť.

#### **8.5 Vyroba vína bez přístupu vzduchu v interní atmosféře**

Zjistilo se, že oxidaci je možné zabránit zpracováním hroznů a výrobou vína v intrní atmosféře. Pokusy se konaly při lisování na lisu Vaslin v atmosféře oxidu uhličitého. Vylisovaný mošt prokvašoval v kovovém tanku a atmosféře CO<sub>2</sub>, takže se vyloučila možnost oxidace. Ve srovnání s kontrolním vínem proběhla ve víně vyrobeném bez přístupu vzduchu jablečno-mléčná fermentace rychleji a obsah těkavých látek byl nižší. Při následujícím uskladnění vína se však ukázalo, že víno nadále vyžaduje prostředí oxidu uhličitého. Zdá se, že interní atmosféra chrání i oxidační enzymy, protože jakmile se víno nechalo v běžné atmosféře, nastala silná oxidace (Farkas, 1980)

#### **8.6 Použití bentonitu**

Přidání bentonitu do moštu před fermentací umožnilo částečné snížení dávky oxidu siřičitého. Bentonit přidaný do moštu před kvašením má schopnost adsorbovat polyfenoly, které způsobují hnědnutí vína. Adsorbuje přitom i část oxidačních enzymů z moštu a vína. V moštech do kterých se přidává bentonit, je tedy možné snížit dávku oxidu siřičitého (Farkas, 1980).

#### **8.7 Hyperoxidace**

Obecně platí, že ne všechny enzymové oxidace vyskytující se v bílém hroznovém moštu jsou na finální produkt špatné. Například hyperoxydace bílého moštu snižuje potenciál enzymatické oxidace vína dvěma způsoby: (zmizení tyrosinasy a vyčerpání oxidovatelných fenolických substrátů během oxidační reakcí, (Ribereau-Gayon,

Dubourdieu, 2006 ); a tvorba GRP, který je odolný vůči další oxidaci. To má za následek vína s nízkým obsahem polyfenolů a vysokým obsahem GRP. Tato vína jsou pak mnohem stabilnější než ty, které jsou vyrobeny z ne-oxidované šťávy, ve kterých jsou vysoké koncentrace polyfenolů, mající vysoký potenciál enzymatické oxidace. Nicméně, během zpracování červeného vína dopad endogenní enzymové oxidace je značně omezená, ale na druhé straně chemická oxidace (ne-enzymatické oxidace) silně ovlivňuje proces zrání vína (Wang a kol., 1990)

Muler Spath jako první opoval nezbytnost síření bílých moštů před alkoholovou fermentací. Jeho práce potom zřetelně dokázaly, že nesíření moštů spolu s přidáním čistého kyslíku do moštu ještě před odkalením zlepšuje stabilitu barvy bílých vín, aniž by to způsobovalo chuťové vady oxidativního typu. Tento postup nazývaný hyperoxidace pozůstává z oxidace polyfenolů moštu, aby se tak vysrážely během odkalování a eliminovaly ještě před alkoholovou fermentací.

Stabilizace barvy bílých vín oxidací moštů je podle odrůdy běžně známá. Hyperoxidace byla rovněž s úspěchem vyzkoušena pro odbarvení a zhodnocení moštů Pinot noir a Mlynářka v Champagne (blanc). Naopak vliv této operace na aromatické kvality vín se hodnotí rozdílně v závislosti na odrůdě a na degustační porotě. Někdy je hodnocena jako prospěšná nebo bez vlivu na aroma alsaských a německých odrůd Chardonnay a Chrupka bílá. Hyperoxidace neboli jednoduše chybějící ochrana moštů před oxidací značně postihuje aroma Sauvignonu (Dubourdieu a Lavigne), obsah 4-methyl-merkaptopentanonu (4MMP) ve vínech je tím menší, čím byl mošt méně chráněn před oxidací.

Oxidace moštů má depresivní účinky na aroma i dalších odrůd (např. Semillon), jejichž aroma se blíží aroma Sauvignonu svým podílem sirných sloučenin. Zdá se, že nejlepší vína Chardonnay se získávají s omezením oxidace moštů (Pascal Ribereau-Gayon, 2006).

### **9.1 Jiné náhledy na enzymatickou oxidaci**

V hroznového moště, enzymatické hnědnutí do značné míry koreluje s obsahem hydroksořicových kyselin, především s kyselinou kaftarovou a kyselinou kutarovou, a je podporována flavanoly (Rigaud a kol., 1991). Kyselina kaftarové nebo kyselina p-

kumarová je oxidována polyfenoloxidázou za vzniku  $\text{o}$ -chinonů kyseliny kaftarové (CTAQ), což jsou silné oxidanty, které mohou oxidovat jiné sloučeniny. To má za následek velké změny v sensorických a barevných vlastnostech vína zavisejících na typech fenolů a reaktivní situaci (Cheynier a kol. 1995) Mezitím budou  $\text{o}$ -chinony produkované v enzymatické oxidaci pokračovat v dalších reakcích podle jejich redoxních vlastností a elektronických vztahů: (1) Za prvé, hydroxylace monofenolů do  $\text{o}$ -difenolů a difenolů do  $\text{o}$ -quinonů se vyskytuje s rychlou oxidačně-redukční reakcí chinonů s nějakou jinou molekulou fenolu, vedoucí k tvorbě dimerů nebo k regeneraci původních fenolů, která je katalyzována kyselinou (Wang, 1990).

(2) Vzniklé chinony mohou také polymerovat a kondenzovat s mnoha jinými sloučeninami (včetně fenolických a ne-fenolických druhů) a nakonec tvořit hnědé pigmenty, což je urychlováno při vyšších hodnotách pH (Wang, 1990).  $\text{O}$ -quinony mohou oxidovat skoro jakýkoliv substrát s nižším potenciálem, jako jsou např. jiné druhy fenolů, kyselina askorbová a  $\text{SO}_2$ , čímž jsou v tomto procesu tyto chinony redukovány zpět na jejich původní fenoly.

Jako elektrofil, chinony mohou reagovat s aminovými deriváty a vodou; na druhé straně,  $\text{o}$ -quinones mohou také reagovat s odpovídajícími hydrochinony, pravděpodobně podstupující pomalé reakce kondenzace a polymerizace a to vede k tvorbě hnědých pigmentů (obr.1) (Robards a kol., 1999).

Nicméně Glutathion (GSH) bude mít vliv na proces oxidace moštu skrz reakci s CTAQ, čímž vznikne 2-S -gluthathionyl kaftarová (GRP). GRP nemůže být oxidován katecholásou, čímž do určité míry omezí oxidační změny barvy, což znamená, že určitá koncentrace GSH v hroznovém moště může regenerovat chinony, vznikající při enzymatické oxidaci, a tím snížit množství hnědých pigmentů (Rigaud a kol., 1991). Na druhé straně, interakce mezi katecholásou a  $\text{SO}_2$  může zabránit produkci GRP. To může mít za následek udržování mnohem déle většího množství volné kyseliny kaftarové a kyseliny **p**-kutarové s vysokým potenciálem enzymatické oxidace. Kromě toho GRP je připraven k oxidaci lakázou nebo CTAQ. Měď také reaguje s GSH a dokonce konkuruje CTAQ, a tím do jisté míry snižuje efektivní obsah GSH a zvyšuje riziko enzymatického oxidace hroznového moštu (Rigaud a kol., 1991).

## 10 Oxidace a redukce v moštu

Při zpracování hroznů, při vytváření, zrání, nasklepování a stárnutí vína probíhají oxidační a redukční procesy, které ve velké míře ovlivňují charakter a chuť vína. Oba tyto děje spolu souvisí, a proto je nazýváme oxidačně-redukční procesy. Intenzitu oxidace a redukce můžeme měřit, její jednotka je redox potenciál. Velikost redox potenciálu závisí na poměru oxidované a redukované části určité látky, dále na počtu elektronů a na konstantě systému  $E_0$ . Závislost tohoto vztahu můžeme vyjádřit rovnicí:

$$E_h = E_0 + 0,058/n * \log \text{Ox/Red}$$

Kde  $E_h$  je elektrodový potenciál,  $E_0$ -standartní elektrodový potenciál,  $n$ -počet elektronů

Z rovnice vyplývá že se zvyšováním oxidace stoupá i hodnota potenciálu a naopak, převládá-li redukce, hodnota potenciálu klesá. Je-li systém oxidován na 50%, pak  $E_h = E_0$ . Stupeň oxidace a redukce závisí i na hodnotě pH. (Farkas,1980)

Během vinifikace potenciál klesá ve fázi fermentace až na asi 100mV a stoupá až k 300 až 400mV během různých technologických manipulací(stáčení, nakvašování, remontáž). Provdzdušněné víno bude mít zvýšený oxidoredukční potenciál, zatímco víno uchované v láhvi, to znamená bez přístupu vzduchu, bude mít oxidoredukční potenciál nižší, a ten bude postupně klesat. Kyslík oxiduje víno obtížně. K oxidaci dochází prostřednictvím takových sloučenin, jako jsou železo, měď, reduktory, kyselina askorbová.(Michlovský,2014)

Proměna oxidované formy látky na redukovanou se nazývá redukce a proměna redukované látky na oxidovanou oxidace. Při redukci látka elektrony přijímá a při oxidaci je odevzdává. Podle některých autorů je biologické okysličování a redukce přemísťování vodíku nebo elektronů, oxidace je ztráta vodíku a redukce připojení vodíku (Farkaš,1980).

Jedna z úvah biologické oxidace vychází z aktivace a přenosu vodíku organické látky. Mechanismus přenosu aktivovaného vodíku k aktivovanému kyslíku se uskutečňuje působením biokatalyzátorů, a to dehydrogenasami a oxidasami.

Při vytváření, zrání a stárnutí vín probíhá oxidace i redukce. Jsou mezi sebou spjaty a nemohou se posuzovat odděleně. Jestliže jedna látka oxiduje, druhá se musí redukovat.

V průběhu kvasného procesu převládá ve víně redukce a redox potenciál se snižuje. Později se redox potenciál zvyšuje a převládá oxidace.

Z tab.č 1 vidíme, že hned po vylisování, dokud byla přítomna kyselina askorbová, neobsahoval mošt chinony vůbec, nebo obsahoval pouze jejich stopy. I redox potenciál byl nižší a barva moštu byla světle zelená. Jestliže se mošt udržuje za přístupu vzduchu, klesá obsah kyseliny askorbové, zvyšuje se obsah chinonů a snižuje se podíl tríslovinových látek. Zvýšil se redox potenciál a barva moštu se změnila ze světle zelené na temně skořicovou.

Doba	Třísloviny (ml 0,1N KMnO <sub>4</sub> na 50 ml moštu)	Chinony	K. Askorbová	Rozpuštěný kyslík	Eh (mV)	pH	Barva moštu
	Celkové množst.		mg/l <sup>-1</sup> moštu				
Při lisování	5,6	0 0	10,5	stopy	320,5	3,1	nazelenalý
Po 1 hod.	5,4	stopy	1,3	3,25	386,6	3,1	slámově. žlutý
Po 3 hod.	4,8	0,7 2,5	0,8	5,20	415,6	3,1	sv. skořicov.
Po 6 hod.	4,2	1,5 6,7	0,3	6,32	435,6	3,1	skořicový
Po 12 hod.	3,6	2,5 10,2	stopy	7,27	475,3	3,0	tm. skořicov.

Tab. č. 1 Změny v obsahu tríslovin a kyseliny askorbové v moštu působením polyfenoloxidas.(Farkas,1980)

Přirozené redukční látky v moštu jsou i organické kyseliny. Čím je jejich obsah vyšší, tím je odolnější proti okysličení, a naopak, čím je jejich obsah nižší, tím víno snadněji podléhá oxidaci. Optimální účinek katecholoxidas nastává v moštu pH 6.8. Při pH 3,1, které je ve víně běžné, je její účinek poloviční. Na aktivitu oxidačních enzymů, zvláště polyfenoloxidázy a peroxidasy, má vliv i teplota. Při nízké teplotě do 10<sup>0</sup>C je aktivita silně inhibována. Optimální aktivita je při 20<sup>0</sup>C. Vysoké teploty 70 až 90<sup>0</sup>C ničí oxidační enzymy. Také déle trvající nižší teploty, například dlouhotrvající působení teploty 40<sup>0</sup>C, ničí oxidační enzymy. Stupeň oxidace se může snížit i vhodným technologickým zásahem, třeba odstředováním moštu, při kterém se odstraní z moštu část pevných částic. Je známo, že oxidační enzymy přilnou na vznášející se nečistoty



v moštu, tj. na pomleté slupky a třapiny hroznů, a při vhodných podmínkách vstupují do oxidačních reakcí. Odstředěním a odstraněním kalových látek se odstraní i převážná část oxidačních enzymů, takže mošt a budoucí víno jsou odolnější vůči enzymovým oxidacím. Množství oxidačních enzymů v moštu a v budoucím víně se může snížit také přidáním bentonitu. Podle prací Milisavljevičových odstraní bentonit přidaný do moštu značnou část oxidačních enzymů, takže mošty ošetřené bentonitem jsou daleko méně náchylné k oxidaci. Podle Ribéreau-Gayona jsou látky, které působí redukčně, ještě málo prozkoumány. Může se však předpokládat, že ve víně jsou určité deriváty cukru, které působí redukčně. Mimo to může být ve víně redukton, kyselina reduktorová a kyselina askorbová (vitamin C), která je značně redukční. Podle *Genevoise* jsou ve vínech deriváty kyseliny vinné, které mají ještě výraznější redukční účinek než vitamín C. Silný redukční účinek má v moštu a ve víně kvasný proces, Zjistilo se, že na začátku kvašení moštu se rychle snižuje množství kyslíku. Přitom rychle klesá i Redox potenciál. Bývá to v období bouřlivého kvašení, kdy se kvasinky velmi aktivně rozmnožují. Při rozmnožování spotřebují kvasinky většinu rozpuštěného kyslíku, a tím se potom značně sníží REDOX potenciál. Joslyn sledoval změny redox potenciálu při kvašení. Zjistil, že při teplotě 24<sup>0</sup>C hodnota redox potenciálu velmi výrazně klesá, při bouřlivém kvašení se snižuje na minimum a koncem kvašení se opět zvyšuje. Výsledky jsou shrnuty v tab. 14.2.(Farkaš, 1982)

## **11 Vliv zpracování hroznů na oxidaci**

Při vinifikaci suchých bílých vín je pro konečnou kvalitu produktu rozhodující řízení předfermentačních operací, to je zpracování hroznů a moštů. Jejich role je mnohonásobná. V poměrně krátké době musí s omezením ztrát tekutin vylisovat a vyčirít moštů při této příležitosti musí rovněž napomoci difuzi v moštu některých složek ze slupek, zejména ovocné vůně hroznů a jejich prekurzorů. Současně tu je nutné omezit rozpoštění sloučenin, které přinášejí bylinné pachy a hořkost a jsou spojené s pevnými částmi hroznů je třeba rovněž vyvarovat se tvorbě substancí, které by mohly narušit stabilitu získaných ovocných vůní, zejména oxidovaných nebo oxidovatelných fenolových sloučenin, které mají schopnost zakrývat některé aroma.(Michlovský,2008)

Ještě předtím, než popíšeme různé používané postupy a jejich důsledky na složení moštu a vín, je třeba ujasnit si principy správně řízené reakce extrakce neboli lisování. Veškerá vinifikace je řetězec elementárních operací" každá musí být vedena snahou o ulehčení těch dalších. Číření moštů se provádí a dosahuje tím snáze, čím je

mošt získaný při výstupu z cedící kádě nebo z lisu relativně méně zatížený částicemi z hroznů. Po nevhodném lisování naopak představuje odkalování nepřekonatelný problém, který sebou přináší příliš zakalený mošt. Již při projektování sklepů se často nepočítá s touto nezbytností. Mimoto produkce kalů při lisování není jediným problémem komplikující odkalování. Je svědectví o brutálním mechanickém zpracování hroznů, které způsobuje příliš velkou difuzi složek moštů s bylinnými znaky (Michlovský, 2014)

Uvedené cíle se dosáhnou tím snáze, čím více jsou splněné následující podmínky:

- a) mechanické tlaky na hrozny jsou malé
- b) mechanické akce schopné rozmačkat slupky jsou omezené
- c) vzestup tlaků je pomalý a postupný
- d) objem moštu vylisovaného při nízkém tlaku je velký
- e) lisování moštu probíhá při teplotě méně než 20 C
- f) rozrušování výlisků během lisování není časté
- g) mošt se ponechává na vzduchu co možná nejméně, je nutné dát ho rychle z dosahu vzduchu a co nejrychleji ho zakvasit

## **12. Experimentální část**

### **12.1 Použitý materiál**

Pro tuto práci jsme použily 24 vzorků v různých obdobích sklizně čily v různých stupních zralosti. K dispozici jsme měli 1 vzorek cabernetu franc, 7 vzorků hibernalu,

## **12.2 Chemikálie**

4-methylkatchol pocházel od Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Ma. Ostatní použité chemikálie byly p.a. kvality od lokálního dodavatelů (Lachema, Penta).

## **12.3 Úprava vzorku**

Zmrazené bobule byly homogenizovány v mixéru a nechány pomalu roztát v přiměřeně velkém igelitovém sáčku. Poté byl ručně vylišován mošt a odstředěny kalové částice (3000 x g; 6 min). S co nejmenší časovou prodlevou byla stanovena aktivita polyfenoloxidas a další analytické parametry.

Stanovení titru kyselin a pH podle skript. Cukernatost stanovena refraktometricky.

## **12.4 Spektrofotometrické stanovení polyfenoloxidas**

Katalytická aktivita polyfenoloxidas byla stanovena měřením přírůstku absorbance při 420nm způsobeným oxidací 4-methylkatecholu na příslušný 4-methyl-1,2-chinon. Do 1,5ml eppendorfky s 950 µl inkubačního pufru a substrátu (50 mM fosfátový pufr obsahující 100mM 4-methylkatecholu o pH 6,5) bylo přidáno 50 µl vzorku moštu, protřepáno a přelito do měřicí kyvety. Reakce probíhala za laboratorní teploty a absorbance byla měřena v 30 sekundových intervalech po dobu 3 minut. Z naměřených hodnot absorbance byl vypočítán přírůstek absorbance za minutu. Výsledky jsou vyjádřeny jednotkách aktivity představující zvýšení absorbance o hodnotu 1 za minutu, vztaženou na 1 ml moštu.

## **12.5 HPLC stanovení kyselin a cukrů**

Vzorky moštu byly ředěny 10x demineralizovanou vodou.

**Instrumentace: Binární vysokotlaký systém Shimadzu LC-10A**

**Systém controler: SCL-10Avp**

**2 pumpy: LC-10ADvp**

**Kolonový termostat s manuálním nástřikovým ventilem Rheodyne: CTO-10ACvp**

**DAD detektor: SPD-M10Avp**

**Software: LCsolution**

**Podmínky separace:**

**Kolona: Watrex Polymer IEX H form 10µm; 250x8 mm + 10x8mm**

**Teplota separace: 60°C**

**Objem nástřiku vzorku: 20ul**

**Průtok mobilní fáze: 0.75 ml/min**

**Isokratická eluce**

**Mobilní fáze: 2 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

**Detekce:**

**Sacharidy: 190nm**

**Kyseliny: 210nm.**

**HPLC stanovení kyselin a cukrů**

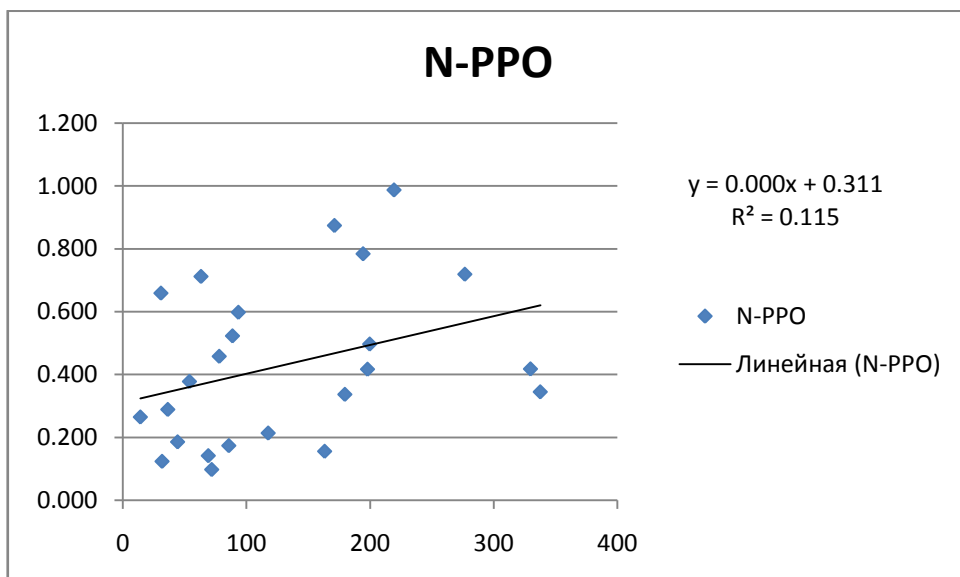
Sacharidy stanovovány při 190nm, organické kyseliny při 210nm. Stanovení jednotlivých analytů bylo provedeno na základě externí kalibrace.

## 12.6 Výsledky analýzy

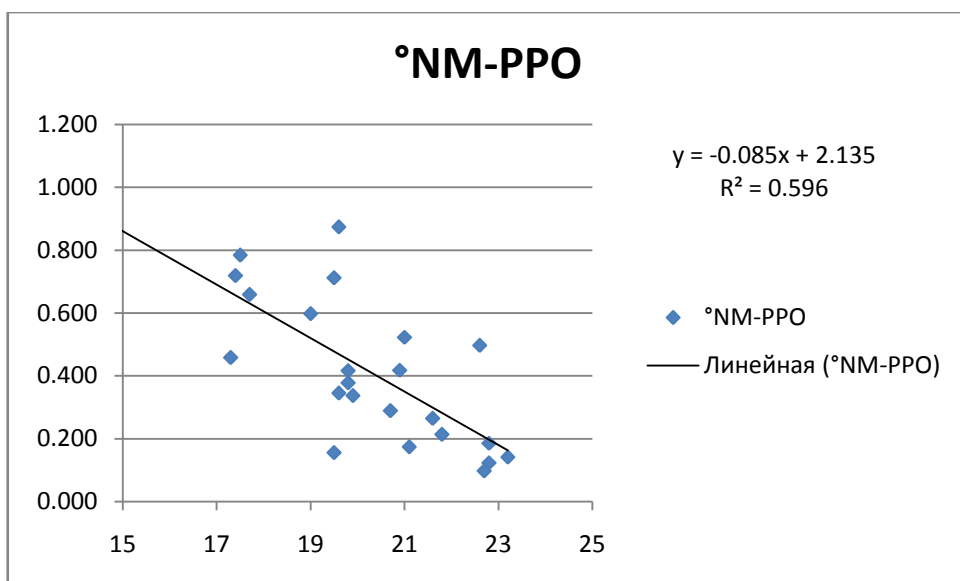
		g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	
			Celková	L-Jablečná		Citrónová		Fru	U/ml
		Vinná	Jablečná		D-Jablečná		Glc		PPO
CF	20.IX	8,82	3,08	3,04	0,04	0,13	95,17	104,37	0,265
Hib	7.IX	7,71	6,24	6,15	0,09	0,14	84,61	94,19	0,458
Hib	14.IX	7,31	5,57	5,43	0,15	0,14	96,35	110,34	0,337
Hib	21.IX	6,74	3,51	3,45	0,06	0,12	98,89	113,46	0,289
Hib	26.IX	6,63	2,64	2,58	0,05	0,10	110,88	128,90	0,186
Hib	6.X	6,03	3,25	3,12	0,13	0,14	107,21	123,81	0,214
Hib	12.X	6,41	3,06	2,98	0,08	0,12	112,15	121,56	0,124
Hib	19.X	5,84	2,03	1,97	0,06	0,09	106,82	121,06	0,098
Lau	7.IX	8,10	4,67	4,64	0,03	0,13	87,94	93,76	0,659
Lau	14.IX	8,08	5,04	5,00	0,04	0,15	91,45	100,66	0,712
Lau	21.IX	9,97	3,69	3,65	0,04	0,09	87,03	94,96	0,598
Lau	6.X	8,61	3,32	3,29	0,03	0,07	96,56	105,37	0,378
Lau	12.X	10,57	2,88	2,85	0,03	0,07	112,60	120,36	0,142
Lau	19.X	8,52	3,03	2,95	0,08	0,10	86,55	100,25	0,174
Lau	26.X	8,68	4,12	3,82	0,29	0,15	85,85	93,20	0,156
RM	14.IX	7,54	4,04	3,96	0,08	0,20	98,11	105,90	0,874
RM	21.IX	6,28	2,85	2,80	0,05	0,17	90,45	97,00	0,523
RM	29.IX	7,24	2,49	2,36	0,13	0,22	112,93	120,72	0,497
Sg	14.IX	5,34	9,24	8,62	0,62	0,30	69,97	68,04	0,987
Sg	21.IX	7,42	8,51	8,12	0,39	0,43	88,65	90,22	0,784
Sg	6.X	7,23	6,43	5,83	0,60	0,13	92,20	93,58	0,345
Sg	11.X	8,22	5,34	4,94	0,40	0,23	106,69	103,81	0,418
VZ	14.IX	8,38	1,55	1,45	0,10	0,17	84,80	90,11	0,719
VZ	21.IX	6,22	2,52	2,26	0,26	0,22	100,08	97,98	0,417

					g/l	mg/l	g/l	g/l
					kyseliny	FAN		Glu + Fru
		°RS	°NM	pH	titračně	formol	HPLC-kyseliny	
CF	20.IX	22,3	21,6	3,12	9,54	14,2695	12,42	199,5
Hib	7.IX	18,6	17,3	2,94	12,60	78,05692	14,87	178,8
Hib	14.IX	20,9	19,9	3,1	11,21	179,6782	13,72	206,7
Hib	21.IX	21,6	20,7	2,94	9,34	36,4665	10,8	212,4
Hib	26.IX	23,4	22,8	3,05	8,46	44,394	9,7	239,8
Hib	6.X	22,5	21,8	3,19	7,73	117,6553	9,84	231
Hib	12.X	23,4	22,8	3,02	8,50	31,83614	9,98	233,7
Hib	19.X	23,3	22,7	2,89	7,20	71,97736	8,22	227,9
Lau	7.IX	19	17,7	2,83	13,31	30,92821	13,48	181,7
Lau	14.IX	20,5	19,5	2,74	14,13	63,3292	13,89	192,1
Lau	21.IX	20,1	19	2,79	12,75	93,5445	14,21	182
Lau	6.X	20,8	19,8	2,93	10,51	53,98302	12,41	201,9
Lau	12.X	23,7	23,2	2,73	11,95	69,209	13,88	233
Lau	19.X	21,9	21,1	2,92	10,76	85,81916	12,04	186,8
Lau	26.X	20,5	19,5	3,06	11,01	163,3332	13,63	179,1
RM	14.IX	20,6	19,6	3,01	9,73	171,234	12,3	204
RM	21.IX	21,8	21	3,02	8,09	88,788	9,67	187,4
RM	29.IX	23,2	22,6	3,21	7,47	199,773	10,28	233,6
Sg	14.IX	15,1	13,2	3,25	12,36	219,443	16,05	138
Sg	21.IX	18,8	17,5	3,2	11,09	194,4059	17,47	178,9
Sg	6.X	20,6	19,6	3,2	10,05	337,7115	14,57	185,8
Sg	11.X	21,7	20,9	3,16	8,99	329,784	14,46	210,5
VZ	14.IX	18,7	17,4	3,08	7,17	276,7296	10,31	174,9
VZ	21.IX	20,8	19,8	3,39	6,28	197,9951	9,32	198,1

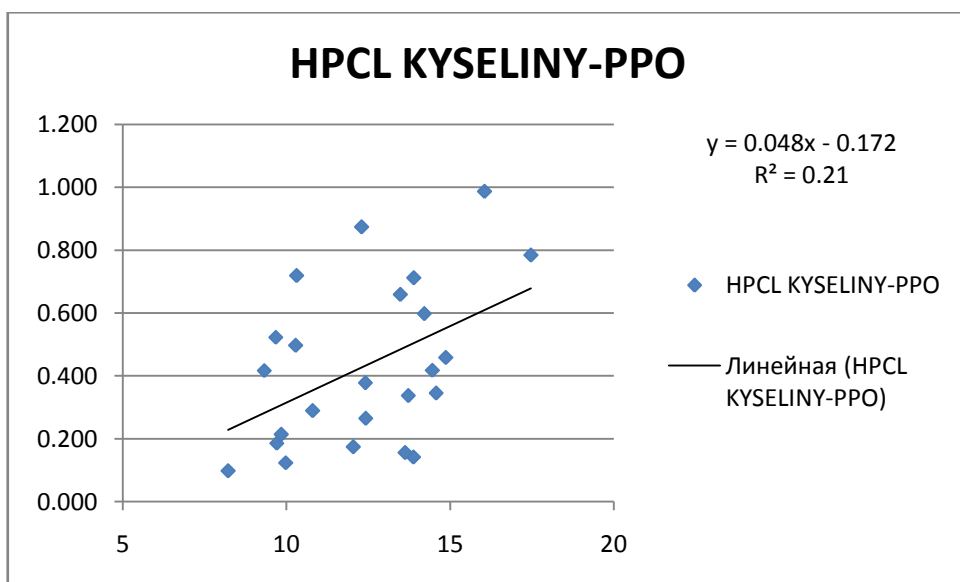
Tab č.2 + Tab.č 3 ukazuje podrobné výsledky analýzy zkoumaných vzorků, z kterých budou vytvořeny grafy jednotlivých vztahů složkám moštu k aktivitě polyfenoloxidasy.



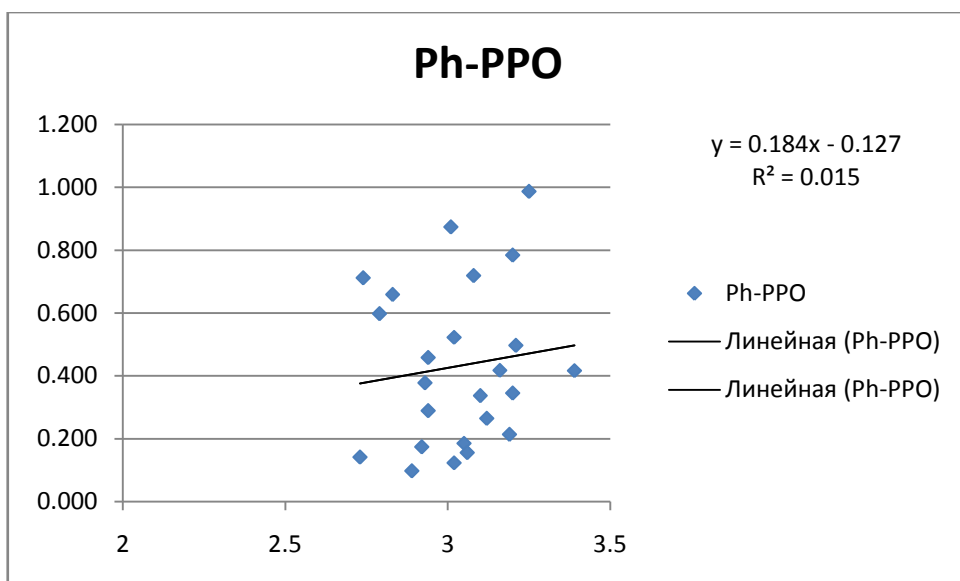
Graf.č.1 Aktivita PPO v závislosti na koncentraci dusíku. Zde se ukazuje, že koncentrace dusíku není na úrovni aktivitě PPO závislé.



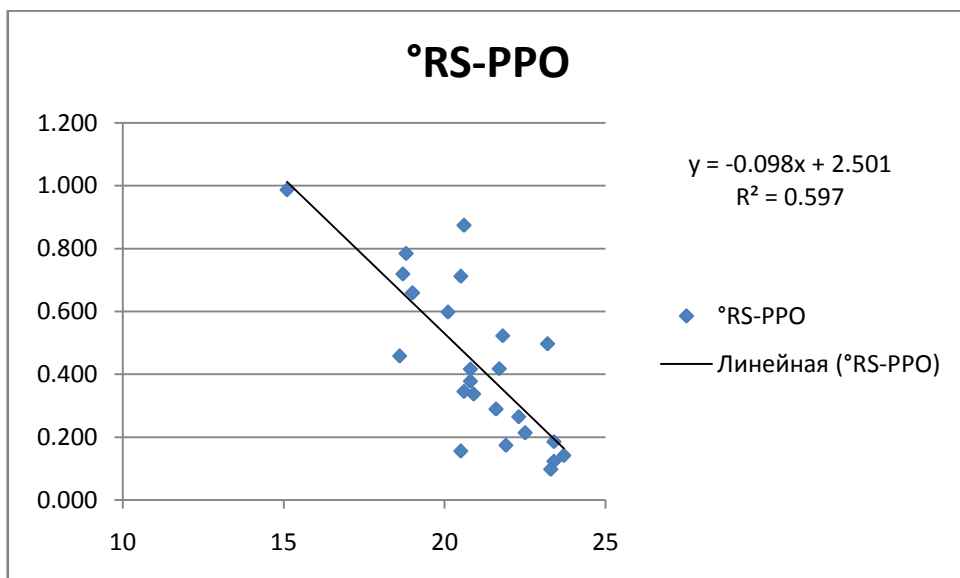
Graf č.2 Aktivita PPO v závislosti na cukernatosti. Graf nám ukazuje snižující se aktivitu PPO se zvyšující se cukernatosti.



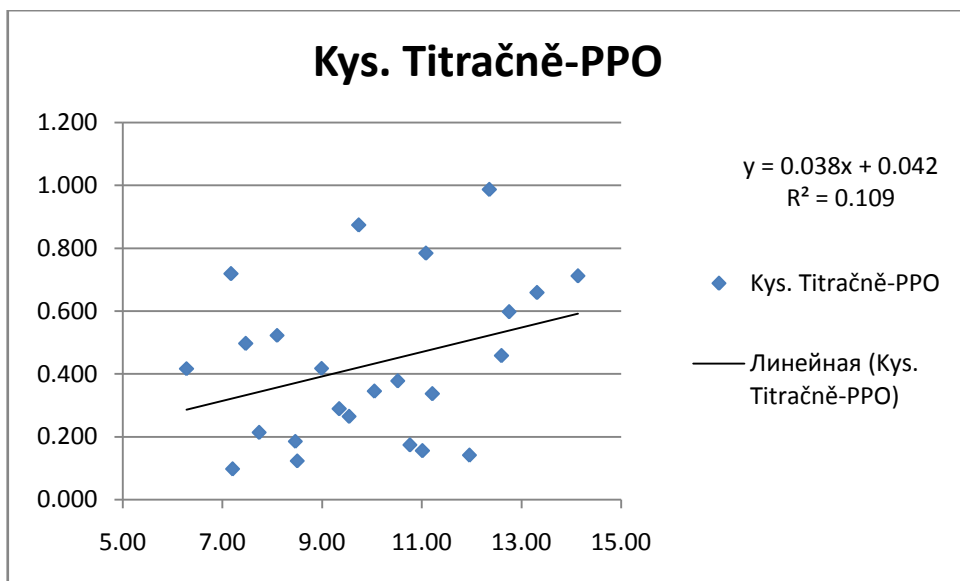
Graf č. 3 Aktivita PPO v závislosti na HPCL kyselinách. Graf ukazuje, že HPLC kyseliny aktivitu PPO rapidně neovlivňují.



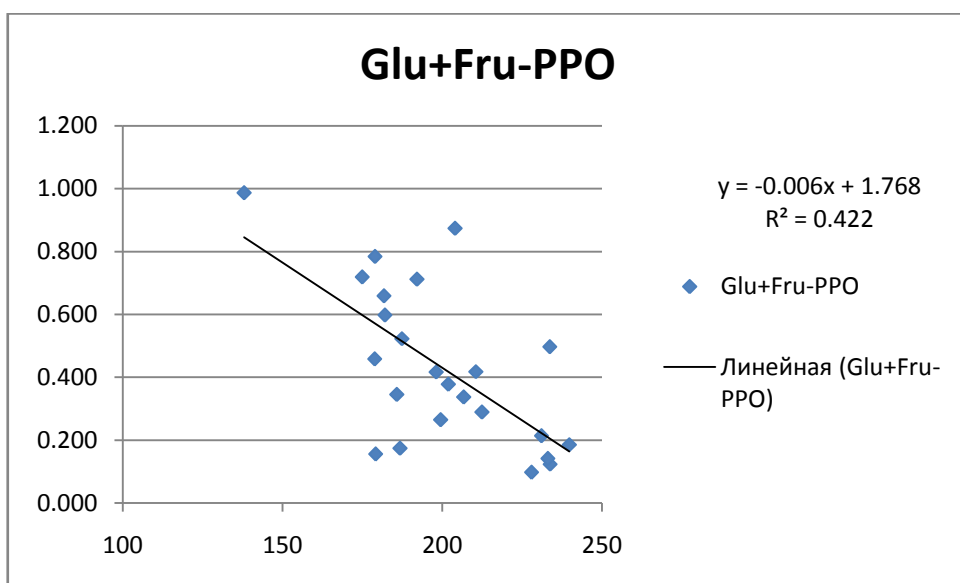
Graf. č.4 Aktivita PPO v závislosti na Ph moštu. V tomto pokus mělo většina vzorků pH 3.1. Aktivita PPO se projevovavala v různých úrovních jednotlivých vzorků variabilně i přes podobnou hodnotu pH.



Graf č.5 Aktivita PPO v závislosti na °RS. Zde je jasně prokázáno, že se zvyšující se koncentrace °RS aktivita PPO klesá.

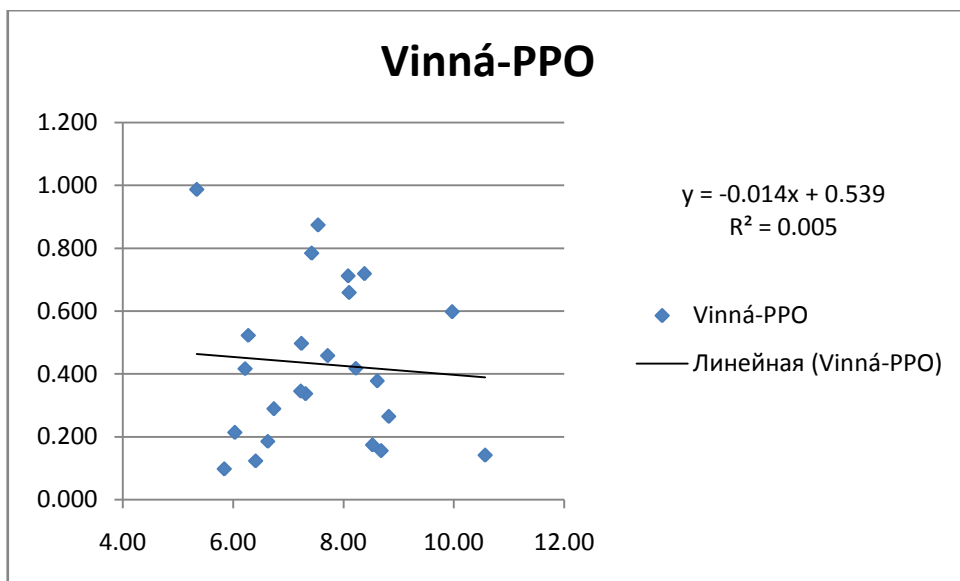


Graf č.6 Aktivita PPO v závislosti Titračních kyselinách. Z grafu plyne, že vliv titračních kyselin aktivitu PPO je zanedbatelná.

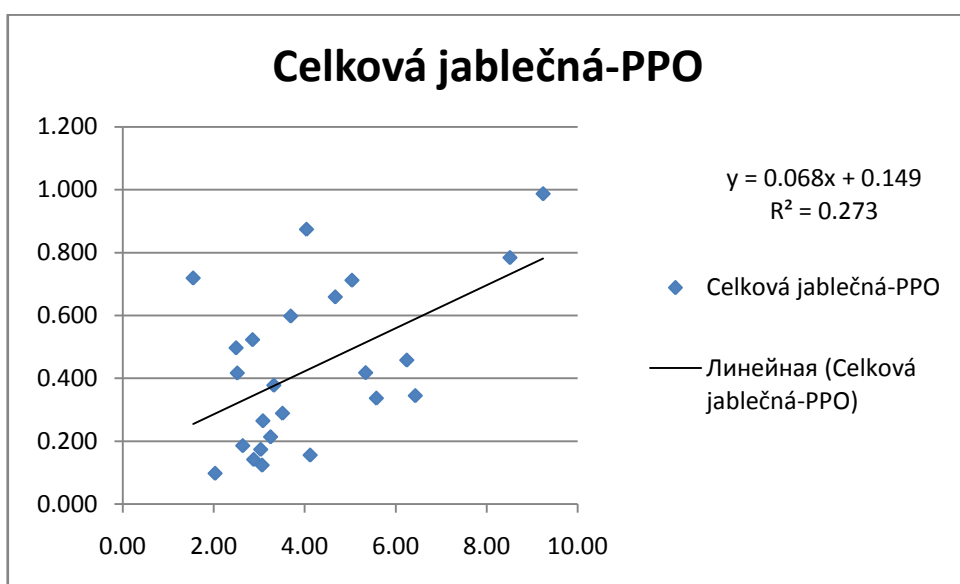


Graf č.7 Aktivita PPO v závislosti Glukóze + fruktóze. Z grafu je patrné, že aktivita PPO má klesající tendenci se zvyšující se koncentrace Glukózy + frukózy.

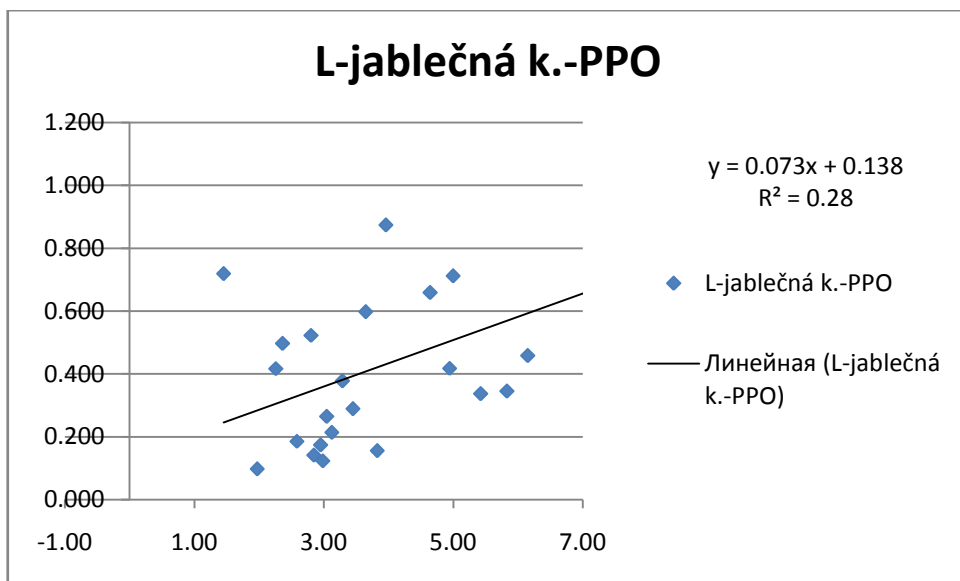




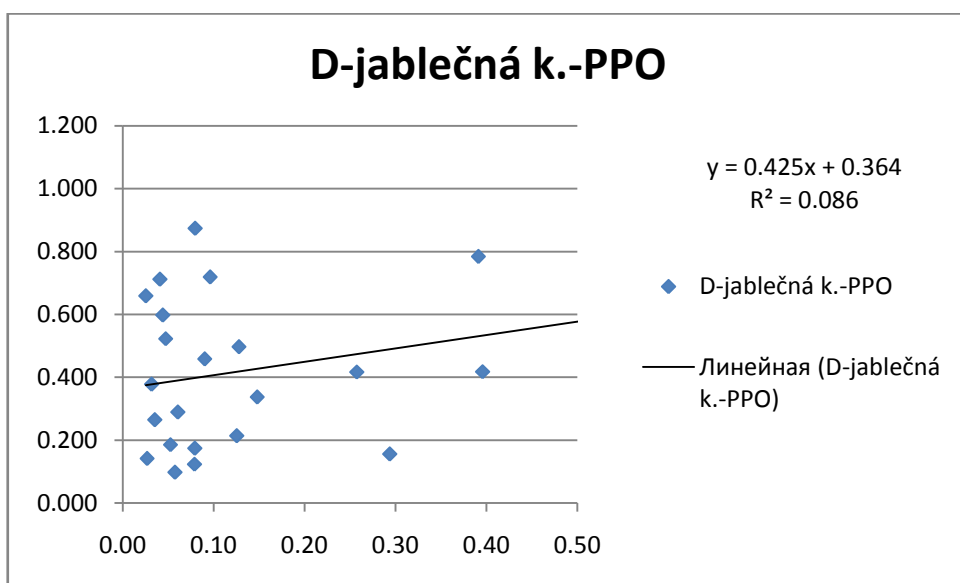
Graf č.8 Aktivita PPO v závislosti. V tomto grafu s nasbíraných výše uvedených dat aktivita PPO na koncentraci kyselině vinné nezávisí.



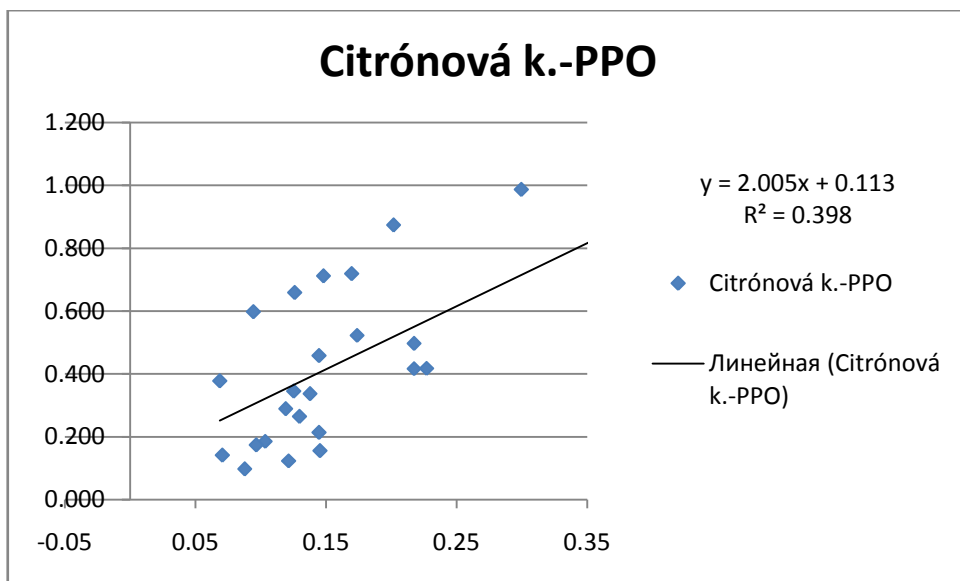
Graf č.9 Aktivita PPO v závislosti na celkové jablečné kyselině. Na tomto grafu se aktivita PPO mírně snižuje se snižující se koncentrací celkové jablečné kyselině.



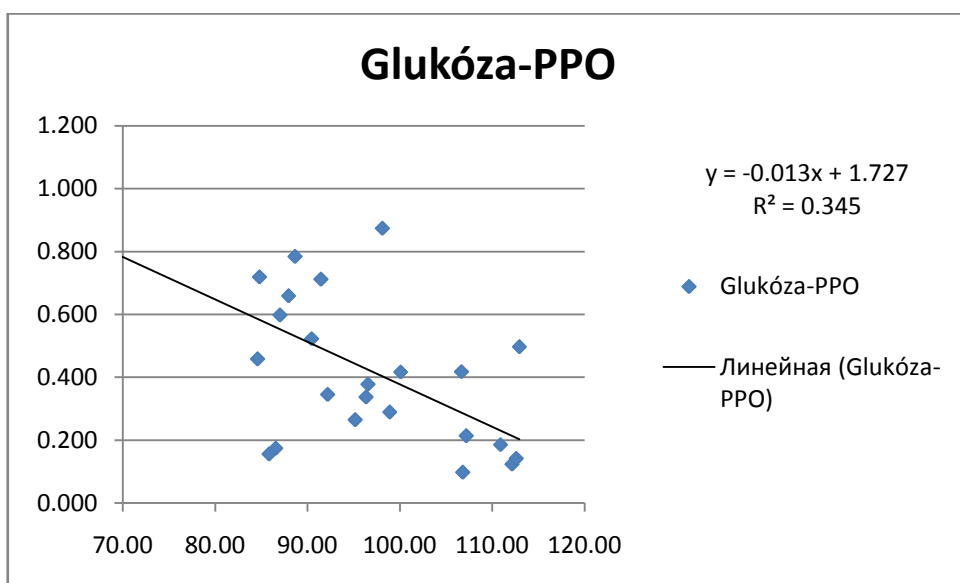
Graf č.10 Aktivita PPO v závislosti na L-Jablečné kyselině. Nevidím zde žádnou velkou závislost této enzymatické aktivity (PPO) na množství kyseliny L-jablečné.



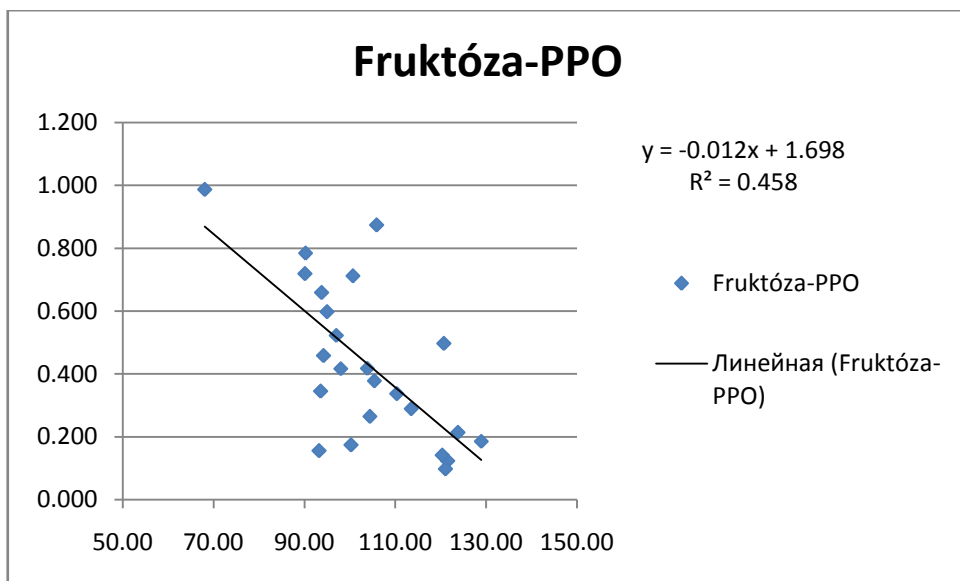
Graf č.11 Aktivita PPO v závislosti na D-Jablečné kyselině. S výše uvedených hodnot vzorků uvedený graf neukazuje žádnou souvislost mezi koncentracemi těchto parametrů.



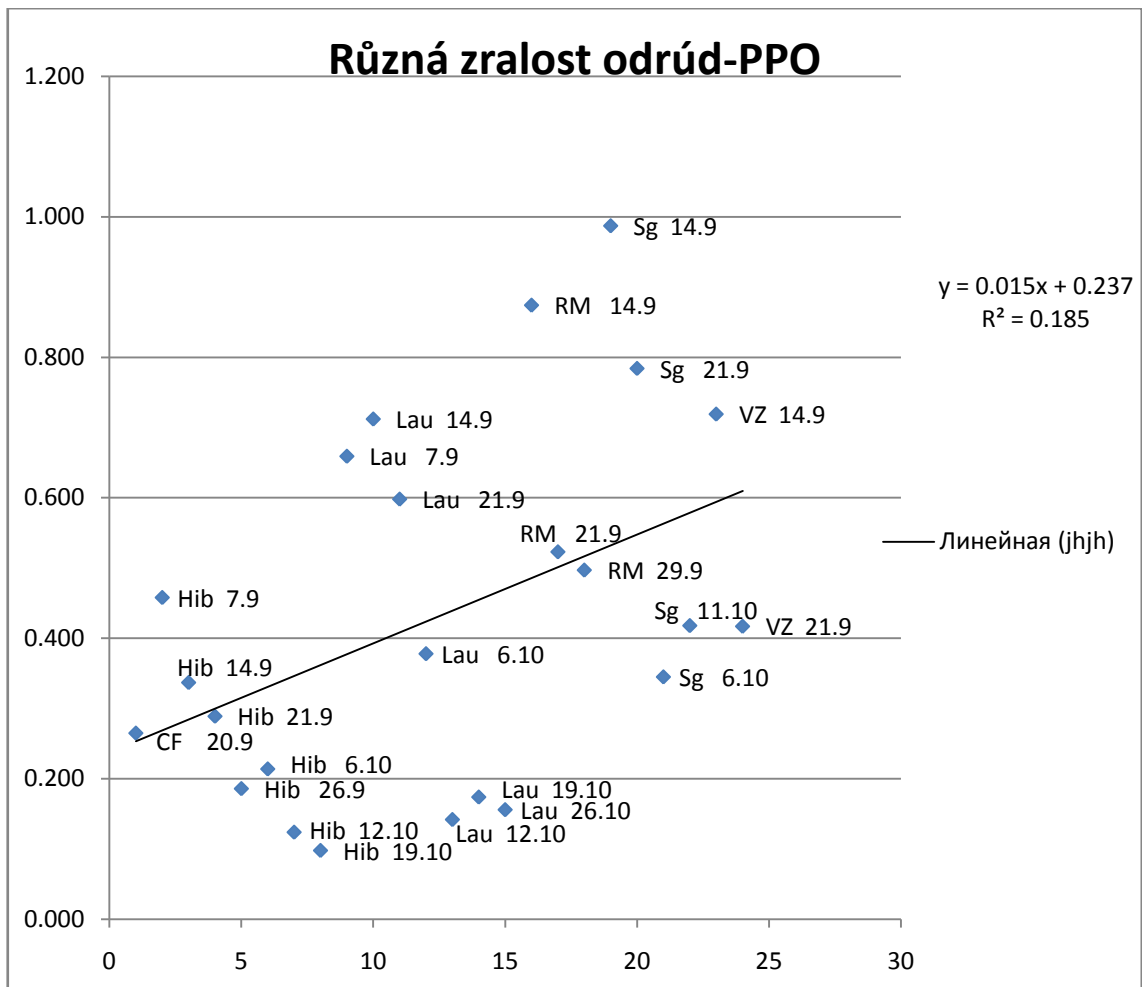
Graf č.12 Aktivita PPO v závislosti na kyselině citrónové. Tento graf ukazuje, že aktivita PPO klesá spolu s klesající koncentrací kyseliny citrónové.



Tab.13 Aktivita PPO v závislosti na koncentraci glukózy. Na tomto grafu jde vidět, že s mírným nárůstem koncentrace glukózy enzymatická aktivita klesá.



Graf č. 15 Aktivita PPO v závislosti na koncentraci fruktózy. Graf nám jasně ukazuje snižující tendenci aktivity PPO s rostoucí koncentrací fruktózy. Většina cukernatých parametrů nám ukazuje snižující aktivitu PPO se zvyšující se koncentrací těchto látek. Mohlo by to souviset s tím, že se zvyšujícím se stupněm zralosti se obecně aktivita PPO snižuje.



Graf č.16 Aktivita PPO v závislosti na datumu odběru jednotlivých odrůd. Tento graf potvrzuje, že zvyšujícím se stupněm zralosti se PPO aktivita snižuje.

## 13 Závěr

Literární část této práce kladla důraz na co nejširší znalosti oxidativních enzymů a jejich mechanismu a s ní související oxidace moštu. Z práce je patrné že hydroskořicové kyseliny a jejich deriváty jsou hlavními substráty oxidativních enzymů. Tyto enzymy prostřednictvím kyslíku snadno oxiduje a způsobuje zhnědnutí moštu.

Nejčastějšími substráty pro tyto enzymy jsou kyselina kaftarová a kyselina ferulová, jenž jim tyto enzymy z jejich struktury odeberou vodík a vzniknou tak jejich na příslušné chinony. Protože se jedná o oxidoreduktázy, kyslík je katalyzátorem těchto oxidačních reakcí. Pro praktické vinařství je nejdůležitější znalost jejich inaktivace, čili způsob ochrany moštu před oxidací. Zajímavá by mohla být kombinace bentonitu a tím menší množství použití oxidu siřičitého. Ohřev moštu je příliš riskantní a provádí se jen u silně znečištěných moštů. Je prokázáno, že pokud jsou dodrženy správné postupy, aktivité tyrozinázy se dá úplně vyhnout.

Problematičtější je to s aktivitou lakázy, protože přítomnost tohoto enzymu způsobují hrozny napadené zhoubnou plísní šedou. Je možné udělat maximum např. zelenými prcemy a nejmodernějšími technologickými postupy, ale to co ovlivnit nelze je nepříznivé klima určitého roku. Navíc se tato plíseň dá v ranných stádiích těžko rozpoznat. Ideální by byla laboratoř, která by byla součástí vinařského provozu pro přesné stanovení lakázní aktivity v moštu. Takový mošt totiž potřebuje daleko větší ochranu, protože její aktivita dokáže dlouho přetrvávat i přes větší dávky SO<sub>2</sub>, což už vzhledem začátku celého procesu vinifikace způsobovat velké problémy.

Praktická část byla zaměřena na stanovení aktivity polyfenoloxidasu jednotlivých vzorků s několika jednotlivými složky moštu. Bylo k dispozici sedm vzorků Hibernálu v různých stupních zralosti, sedm Laurotů, tři Rulandské modré, čtyři Sauvignony, dva vzorky Veltlínského zeleného a jeden Cabernet franc. Podle výsledků jsem zjistil, že podle stupně zralosti nejmenší aktivitu PPO vykazovala odrůda Laurot. Co se týče jednotlivých parametrů či složek moštu, ukázalo se, že velkou závislost na snižující se aktivitě PPO vykazovaly zvyšující se koncentrace fruktózy, glukózy, cukernatosti. Dále větší závislost klesající tendence aktivity s klesající koncentrací kyseliny citrónové. Ačkoliv se to zdá být překvapivé, tak obecně kyseliny neměly na aktivitu PPO výrazný vliv. Je jasné, že odběr jakýchkoliv jiných vzorků by měl jiné hodnoty v závislosti na

mnoha faktorech. Obecně se dá říct, že ze zvyšujícím se stupněm zralosti polyfenoloxidátní aktivita klesá.

#### **14. Seznam použité literatury**

Bradshaw, M. P., Cheynier, V., Scollary, G. R., & Prenzler, P. D. (2003). Defining the ascorbic acid crossover from anti-oxidant to pro-oxidant in a model wine matrix containing (+)-catechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14), 4126–4132.

Bradshaw, M. P., Scollary, G. R., & Prenzler, P. D. (2004). Examination of the sulfur dioxide-ascorbic acid anti-oxidant system in a model white wine matrix. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84 (4), 318–324.

Carla Oliviera, Antonio Ferreira, Arthur M.S. Silva. Oxidation mechanisms occurring in wines. Article in *Food research international*, 2011

WJ. Du Toit, Marais J., I.S. S. Pretorius, M. du Toit. Oxygen in must and wine: A review. Department of Viticulture and Oenology, South Africa, 2006

Danilewicz, J. C., Seccombe, J. T., & Whelan, J. (2008). Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59, 128–136

Danilewicz, J. C. (2003). Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 73–85

Danilewicz, J. C., Seccombe, J. T., & Whelan, J. (2008). Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59, str. 128–136.

FARKAŠ, Jan. *Technologie a biotechnologie vína*. Vyd 2. Praha: Nakladatelství technické literatury., 1980, str. 405-407, 235. ISBN 04-825-79

FARKAŠ, Jan. *Technologie a biotechnologie vína*. Vyd 2. Praha: Nakladatelství technické literatury., 1980, str. 445-446. ISBN 04-825-79

Kilmartin, P. A., Zou, H., & Waterhouse, A. L. (2001). A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, str. 1957–1965.

Li, H., Wang, H., Yuan, C., & Wang, S. (2005). *Wine chemistry*. Beijing: Scientific Publishing Company.

Marks, A. C. (1990). The use of ascorbic acid to enhance sparkling wine oxidative stability. Ph.D. Thesis, University of Arkansas, AR, United States.

MICHLOVSKÝ, Miloš. Příprava bílých vín. Vyd 1. Rakvice: Vinselekt Michlovský a.s, 2014, str. 59, 30-31, 42-43. ISBN 978-80-905319-4-9

MICHLOVSKÝ, Miloš. Lexikon chemického složení vína. Vyd 1. Rakvice: Vinselekt Michlovský a.s., 2014, str. 77, 194. ISBN 978-80-905319-2-5

M. Victoria Moreno-Arribas, M. Carmen Polo. *Wine chemistry and biochemistry*. Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Madrid Spain, 2009, str. 509-514 ISBN 978-0-387-7416-1

Pascal Ribereau-Gayon, Denis Dubourdieu, Bernard Doneche, Aline Lonvaud., *Handbook of Enology Vol. 1. The Microbiology of Wine and Vinifications* 2nd Edition, str. 323, 318-319, 419-420, 2006., ISBN: 0-470-01034-7

Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66 (4), 401–436.

Rigaud, J., Cheynier, V., Souquet, J. M., & Moutounet, M. (1991). Influence of must composition on phenolic oxidation kinetics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 57 (1), 55–63

Salgues, M., Cheynier, V., Gunata, Z., & Wylde, R. (1986). Oxidation of grape juice 2-S-glutathionylcaffeoyltartaric acid by *Botrytis cinerea* laccase and characterization of a new substance: 2,5-di-S-glutathionylcaffeoyltartaric acid. *Journal of Food Science*. 51, 1191–1194.



Sánchez-Ferrer, A., Rodríguez-López, J. N., García-Cánovas, F., & García-Carmona, F. (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1247, 1–11.

Shchepinov, M. S. (2007). Reactive oxygen species, isotope effect, essential nutrients, and enhanced longevity. *Rejuvenation Research*, 10, str. 47–60

Singleton, V. L. A. (2000). Survey of wine ageing reactions, especially with oxygen. *Proceedings of the ASEV 50th Anniversary Annual Meeting* (str. 323–336). Davis, California: American Society for Enology and Viticulture

Singleton, V. L., Trousdale, E., & Zaya, J. (1979). Oxidation of wines I. Young white wines periodically exposed to air. *American Journal of Enology and Viticulture*, 30, 49–54

VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. Vyd 2. Tábor: nakladatelství OSSIS., 2002, str. 48. ISBN 80-86689-01-1

Kumšta M. *Vinařský obzor*, číslo 6. Hydroskořicové kyseliny, str. 33, 2007

Wang, Z. *Food etymology* Beijing: China Light Industry Press. 1990

Waterhouse, A. L., & Laurie, V. F. (2006). Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 306–313

([Http: // www. Dcnutrition com / aminokyseliny /.](http://www.Dcnutrition.com/aminokyseliny/))

