

Mendelova univerzita v Brně
Zahradnická fakulta v Lednici

Studium flavonoidů v červených vínech

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce

doc. Ing. Jiří Sochor, Ph.D.

Vypracovala

Bc. Alexandra Kandouřová

Lednice 2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Bc. Alexandra Kandourova**

Studijní program: Zahradnické inženýrství

Obor: Řízení zahradnických technologií

Název tématu: **Studium flavonoidů u červených vín**

Rozsah práce: minimální rozsah 50 stran

Zásady pro vypracování:

1. Prostudujte dostupnou literaturu ohledně obsahu flavonoidů u červených vín a zpracujte na toto téma literární rešerši.
2. Vyberte vzorky červených moštů a z nich následně vyrobených vín. Pomocí vysoce-účinné kapalinové chromatografie stanovte obsah vybraných flavonoidů v časových intervalech v průběhu výroby vína.
3. Získaná data vyhodnoťte a zpracujte.
4. Výsledky diskutujte, zaměřte se na sledování obsahu flavonoidů v průběhu výroby vína.

Seznam odborné literatury:

1. BAČOVSKÁ, N. – KOMÍNKOVÁ, M. – RUTTKAY-NEDECKÝ, B. – KOPEL, P. – TRNKOVÁ, L. – ZÍTKA, O. – ADAM, V. – KIZEK, R. Electrochemical study of flavonoids in wine. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. 2014. sv. 1, č. 2, s. 52–55. ISSN 2336-3940.
2. PAPOUŠKOVÁ, B. – BEDNÁŘ, P. – HRON, K. – STÁVEK, J. – BALÍK, J. – MYJAVCOVÁ, R. – BARTÁK, P. – TOMÁNKOVÁ, E. – LEMR, K. Advanced liquid chromatography/mass spectrometry profiling of anthocyanins in relation to set of red wine varieties certified in Czech Republic. *Journal of Chromatography A*. 2011. sv. 1218, č. 42, s. 7581–7591. ISSN 0021-9673.
3. BAROŇ, M. – KUMŠTA, M. Comparison of North Italian and South Moravian wines on the base of their antioxidant activity, phenolic composition and sensory quality. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2012. sv. 60, č. 8, s. 9–18. ISSN 1211-8516.
4. MATĚJČEK, D. – MIKEŠ, O. – KLEJDUS, B. – ŠTĚRBOVÁ, D. – KUBÁŇ, V. Changes in Content of Phenolic Compounds During Maturing of Barrique Red Wine. *Food Chemistry*. 2005. sv. 90, č. 1, s. 791–800. ISSN 0308-8146.

Datum zadání diplomové práce: listopad 2015

Termín odevzdání diplomové práce: duben 2017

L. S.



Bc. Alexandra Kandouřová
Autorka práce



doc. Ing. Jiří Sochor, Ph.D.
Vedoucí práce



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



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

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma:

„Studium flavonoidů v červených vínech“

vypracovala 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 vědoma, 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:

.....

Poděkování:

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi při psaní této diplomové práce pomohli, hlavně vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Jiřímu Sochorovi, Ph.D. za průběžné připomínky k této práci. Dále bych ráda poděkovala doc. Ing. Mojmíru Baroňovi, Ph.D., za konzultace, cenné rady a podporu. V neposlední řadě Ing. Michalu Kumštovi za pomoc při vyhodnocování experimentální části mé práce a Bc. Jiřímu Blaschovi za pomoc s pokusem.

Obsah

1. Úvod.....	10
2. Cíl práce.....	12
3. Literární rešerše	13
3.1 Fenolové sloučeniny.....	13
3.2 Flavonoidy.....	15
3.2.1 Antokyany	16
3.2.2 Flavonoly.....	19
3.2.3 Flavanololy	21
3.2.4 Flavony	23
3.3 Výskyt a role v rostlinách	24
3.4 Vliv délky a způsobu macerace na obsah polyfenolických sloučenin	26
3.4.1 Klasická macerace	26
3.4.2 Kryomacerace.....	26
3.4.3 Teplota a čas	27
4. Experimentální část.....	29
4.1 Materiál	29
4.1.1 Popis odrůdy Rulandské modré.....	29
4.1.2 Charakteristika stanoviště.....	31
4.2 Metodika práce	32
4.3 Metody	34
4.3.1 Stanovení cukernatosti refraktometrem.....	35
4.3.2 Stanovení pH	35
4.3.3 Stanovení veškerých titrovatelných kyselin	36
4.3.4. Stanovení celkového asimilovatelného dusíku.....	36

4.3.5 Stanovení obsahu vybraných flavonoidů pomocí HPLC	37
4.3.6 Stanovení celkové antioxidační aktivity.....	38
4.3.7 Stanovení obsahu celkových fenolických sloučenin	39
4.3.8 Stanovení celkových antokyanů	39
4.3.9 Stanovení celkových flavanolů.....	40
5. Výsledky	41
5.1 Stanovení obsahu celkových fenolických látek.	41
5.2 Stanovení celkové antioxidační aktivity	43
5.3 Stanovení obsahu celkových flavanolů	45
5.4 Stanovení obsahu antokyanů	46
5.6 Stanovení obsahu vybraných flavonoidů pomocí HPLC	47
5.7 Stanovení obsahu fenolových kyselin pomocí HPLC.....	49
6. Diskuze	53
7. Závěr	55
8. Souhrn	56
9. Resumé.....	56
9. Seznam použité literatury	58

Seznam obrázků

Obr. 1 Schéma flavonoidů

Obr. 2 Schéma antokyanů

Obr. 3 Kyanidin

Obr. 4 Peonidin

Obr. 5 Malvidin

Obr. 6 Delfinidin

Obr. 7 Pelargonidin

Obr. 8 Petunidin

Obr. 9 Schéma flavonolů

Obr. 10 Kaempferol

Obr. 11 Quercetin

Obr. 12 Myricetin

Obr. 13 Isorhamnetin

Obr. 14 Katechin

Obr. 15 Epikatechin

Obr. 16 Epikatechin galát

Obr. 17 Epigallokatechin

Obr. 18 Apigenin

Obr. 19 Luteolin

Obr. 20 Schéma experimentu

Obr. 21 Přístroj MIURA ONE

Seznam grafů

Graf 1: Vývoj celkových fenolů u všech variant macerace vyjádřeny jako mg.l^{-1} ekvivalentu kyseliny gallové

Graf 2: Hodnoty antiradikálové aktivity u všech variant macerace vyjádřeny jako mg.l^{-1} ekvivalentu kyseliny gallové

Graf 3: Hodnoty redukční síly u všech variant macerace vyjádřeny jako mg.l^{-1} ekvivalentu kyseliny gallové

Graf 4: Vývoj celkových flavanolů u všech variant macerace vyjádřeny jako mg.l^{-1} ekvivalentu katechinu

Graf 5: Vývoj antokyanů u všech variant macerace vyjádřeny jako mg.l^{-1}

Graf 6: Hodnoty katechinu u variant PN 0 a PN 14 vyjádřeny jako mg.l^{-1}

Graf 7: Hodnoty epikatechinu u variant PN 0 a PN 14 vyjádřeny jako mg.l^{-1}

Graf 8: Hodnoty kyseliny galové u variant PN 0 a PN 14 vyjádřeny jako mg.l^{-1}

Graf 9: Hodnoty kyseliny vanilové u variant PN 0 a PN 14 vyjádřeny jako mg.l^{-1}

Graf 10: Hodnoty kyseliny syringové u variant PN 0 a PN 14 vyjádřeny jako mg.l^{-1}

Graf 11: Hodnoty kyseliny protokatechuové u variant PN 0 a PN 14 vyjádřeny jako mg.l^{-1}

Graf 12: Hodnoty kyseliny hydroxybenzoové u variant PN 0 a PN 14 vyjádřeny jako mg.l^{-1}

1. Úvod

Polyfenolické sloučeniny vytváří velkou skupinu látek, které jsou odpovědné za kvalitu, strukturu, barvu a chuť zejména červeného vína. K polyfenolickým sloučeninám patří např. flavonoidy, stilbeny, taniny.

Flavonoidy jsou zodpovědné za barvu a trpkosti červených vín a za žlutý odstín zoxidovaných bílých vín, a také se podílí na zákalech a sraženinách, a dalších technologických problémech (např. ucpání filtrační membrány, adsorpce na povrchu nádrže).

K nejčastějším flavonoidům ve víně patří antokyany, flavonoly a flavanoly. Prokyanidiny, nazývané také kondenzované taniny, patří k flavanolům a jsou odpovědné za hořkost a trpkost vína. Antokyany odpovídají za stabilitu barvy červeného vína.

Flavonoidy jsou sloučeniny, které se běžně vyskytují v přírodě a náleží do skupiny rostlinných sekundárních metabolitů. V posledních letech byl zaznamenán zvýšený zájem o jejich studium, jelikož mají blahodárné účinky na lidské zdraví.

Tyto organické pigmenty si lidský ani jiný živočišný organizmus sám nevytvoří, ale může je přijímat při konzumaci ovoce, zeleniny, některých semen či nápojů.

Z výsledků mnoha klinických a experimentálních sledování vyplývá široké spektrum jejich účinnosti. Flavonoidy jsou spojovány především se snížením rizika kardiovaskulárních chorob a chronických onemocnění, s antioxidační aktivitou, represivním účinkem proti zánětům a růstu bakterií či virů nebo protektivním vlivem na vznik některých nádorů. Současně jsou analyzovány souvislosti mezi pozitivními zdravotními aspekty flavonoidů a jejich zvýšenou konzumací v potravě se zastoupením ovoce a zeleniny, a také v kakau, kávě, čaji či víně.

Flavonoidy jsou řazeny mezi přírodní antioxidanty a společně s některými látkami dokážou reagovat s kyslíkovými radikály. Jednou z nejvíce známých hypotéz je tzv. „francouzský paradox“. Tato hypotéza se opírá o zjištění, že strava Francouzů je bohatá na nasycené tuky, ale Francouzi pijí také téměř ke každému jídlu červené víno, kterému je připisováno téměř třikrát menší riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění než ve Spojených státech amerických, kde lidé ve stravě přijímají méně nasycených tuků, ale nevypijí tolik červeného vína.

Velký vliv na obsah flavonoidů především v červeném víně má macerace, během které se do vína vyluhují hlavně antokyany, pak některé flavanoly např. prokyanidiny a katechiny. Existují různé způsoby macerace jako například klasická, karbonická, kryomacerace a postfermentační macerace, která vyplývá z nutnosti prodloužení extrakci i po ukončení fermentace.

2. Cíl práce

Cílem práce bylo prostudovat dostupnou literaturu ohledně obsahu flavonoidů v červených vínech.

Praktická část byla zaměřena na stanovení obsahu fenolických látek, antokyanů, flavanolů a stanovení antioxidační aktivity. Dál také na stanovení obsahu vybraných flavonoidů pomocí kapalinové chromatografie v průběhu macerace, včetně předfermentační a postfermentační macerace.

Účelem bylo získané výsledky zpracovat a vyhodnotit vhodnými statistickými metodami.

3. Literární rešerše

3.1 Fenolové sloučeniny

Fenolové sloučeniny mají důležitou funkci ve vinařství, protože jsou odpovědné za všechny rozdíly mezi bílým a červeným vínem. Mají baktericidní, fungistatický a antioxidační účinek jak v samotném hroznu, tak i na konzumenta, jednoznačně tedy ovlivňují jeho zdraví. Jejich mimořádné prospěšné látky pro lidské zdraví jsou příčinou tzv. francouzského paradoxu. Tyto látky pochází z různých částí hroznu a během vinifikace se extrahují do vína. Stopové množství pochází z metabolismu kvasinek a také může být získané ze dřeva sudu. (Michlovský, 2015)

Pojem „fenolový“ se používá pro látku, která obsahuje aspoň jednu hydroxylovou skupinu (OH) a aromatické jádro C₆. Polyfenoly obsahují v molekule více než jednu fenolovou skupinu. (Michlovský, 2015)

Fenolové sloučeniny těžko se izolují, a proto jsou teprve od 60. let minulého století předmětem systematických výzkumů. (Michlovský, 2014) Dělí se na nízkomolekulární - fenolové kyseliny, flavonoidy a vysokomolekulární, které vznikají jejich kondenzací. Celkový obsah fenolových látek závisí na půdním složení, klimatu, odrůdě a agrotechnice. Můžeme je najít ve slupce, dužnině a semenech bobule. (Pavloušek, 2011)

Tyto sloučeniny působí na organoleptické vlastnosti vína, ovlivňují vůni a barvu vína, hořkost, plnost, stahující pocit v chuti. Ovlivňují průběh stárnutí moštu a vína. Jejich obsah se v bílém víně pohybuje v množství do 0,25 g.l⁻¹. Macerace a lisování při vysokých tlacích zvyšuje jejich obsah. V červeném víně obsah fenolových sloučenin je do 4,5 g.l⁻¹. Tyto sloučeniny byly dlouhou dobu zatřídovány nepřesně pod pojmem „taninové látky“. Nyní se dělí do třech skupin:

- Fenolové kyseliny
- Třísloviny (taniny)
- Flavonoidy

(Michlovský, 2014)

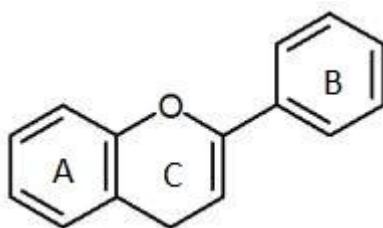
Vzhledem k zvolenému tématu, diplomová práce se bude především zabírat flavonoidy.

Ve třicátých letech 19. století ze dřeva akácie katechové byly izolovány třísloviny, ve kterých byly zjištěny mnohočetné fenolické sloučeniny, v routě zahradní a chmelu otáčivém byl objeven rutin a jeho flavonolový aglykon kvercetin. Ve druhé polovině 19. století se začal studium výskytu flavonoidních a dalších polyfenolických látek v rozličných částech rostlin. Byl zkoumán jejich vliv na barvu květů a listů, vliv na opylující a škodlivý hmyz. Probíhalo studium složení tříslovin a ligninu. V roce 1876 Charles R. Darwin vyslovil hypotézu o vývojové funkci a významu flavonoidů v rostlinách. V prvních dvou desetiletích 20. století došlo k mnoha poznatkům: z tříslovin byly izolovány a identifikovány anthokyanidiny, flavony a flavonoly, z citronové šťávy byla izolována silně redukující látka, považovaná za formu vitamínu C s povahou rostlinného barviva. (Zloch, 2003)

Objevitelem flavonoidů je maďarský biochemik Albert Szent-Györgyi von Nagyrápoly (1893 – 1986). V roce 1936 objevil v kůře citrusových plodů látku (směs glykosidů), aktivující činnost vitamínu C, označil ji jako citrín a analogicky ho spojil s pojmem vitamínu P. Dnes, se setkáme také s názvem rutin. V roce 1937 za objevy týkající se procesů biologické oxidace a zvláště za výzkumy spojené s účinky vitamínu C dostal Nobelovu cenu. (Vachová, 2012)

3.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu, tvořeného dvěma benzenovými jádry (A a B), spojenými heterocyklickým pyranem (C). Běžně bývají substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace. (Ribéreau-Gayon et al., 2006)



Obr. 1 Schéma flavonoidů

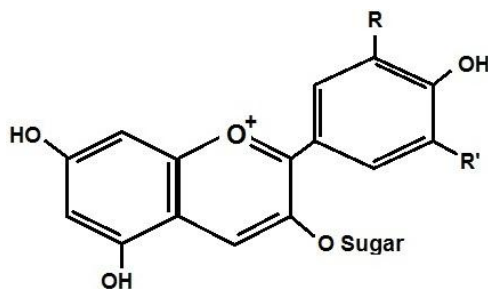
„Flavonoidy jsou často vázány s jednou nebo více molekulami glukozy do sloučenin, které se nazývají glykosidy. Přítomnost molekul glukozy zajišťuje větší rozpustnost flavonoidů ve vodně – alkoholickém prostředí, jakým je víno. Ve víně způsobují hořkost.“ (Michlovský, 2014) Předpokládanou funkcí flavonoidů v révě vinné (ale i v jiných rostlinách) je obrana proti mikrobiálním patogenům, hmyzu a býložravcům. (Michlovský, 2015)

Červené víno je bohatým zdrojem polyfenolických látek. Jak uvádí Creasy et al. (2003), na jedné straně polyfenolické látky tvoří relativně malou část jednotlivých složek vína, v celkovém objemu přibližně 0,15 % u červených vín a 0,025 % u bílých vín. Na druhé straně jsou samotné flavonoidy jejich podstatnou částí a ovlivňují výrazným způsobem kvalitu vína. V červených vínech flavonoidy tvoří více než 85 % z celkového obsahu fenolických látek, tj. 1000 mg.l^{-1} , ve vínech bílých obvykle méně než 20 % celkového fenolického obsahu, tj. 50 mg.l^{-1} . (Jackson, 2008) V bobulí vznikají především ve slupce a v semenech, v menším množství i v třapině. (Michlovský, 2015)

Flavonoidy jsou rozdělovány do 4 základních skupin: antokyany, flavonoly, flavanoly, flavony. Jejich podrobnější popis bude v následujících podkapitolách.

3.2.1 Antokyany

Jsou ve vodě rozpustné rostlinné pigmenty, které odpovídají za modrou, fialovou, a červenou barvu mnoha rostlinných tkání. Vyskytují se především jako *O*-glykosidy. (Ronald L. Prior, 2012)



Obr. 2 Schéma antokyanů

Antokyany jsou základem červeného zbarvení vín. Volné antokyany nejsou stabilní, proto pro uchování barvy je nezbytná polymerizace. Stabilizace barvy probíhá prostřednictvím mechanismů krátkodobých např. kopigmentace nebo dlouhodobých např. polymerace s flavan-3-oly a prokyanidiny, nebo vytváření nových pigmentů, např. pyranoantokyanidinů, které mohou reagovat s taniny. (Michlovský, 2015)

Antokyanová barviva se nacházejí nejvíce v modrých odrůdách révy vinné a to ve vakuolách buněk slupky. U některých odrůd i v dužnině. Vytvářejí se nejvíce během zrání hroznů v závislosti na kvalitě ročníku. (Pavloušek, 2011) Na biosyntézu antokyanů má velký vliv teplota a světlo. Teplota bobule se zvyšuje s tokem světla. Účinek světla je nejvíce významný u odrůd s červenou slupkou např. ‘Rulandské šedé’, ‘Pálava’, ‘Tramín červený’, protože bez světla by jejich slupka nezčervenala. Oslunění modrých hroznů je v horkém klimatu škodlivé, ale ve střední Evropě je prospěšné. Také má vliv i voda, při její nedostatku obsah antokyanů se zvyšuje. (Michlovský, 2015)

„Z hlediska názvosloví se termín antokyany používá pro označení:“

- Antokyanidinů, tj. struktury bez navázaných cukerných jednotek (tzv. aglykony). K antokyanidinům patří pelargonidin, kyanidin, peonidin, delphinidin, malvidin a petunidin.
- Antokyaninů (ve formě glykosidů) – svázání cukru s aglykonem, kterým je antokyanidin.

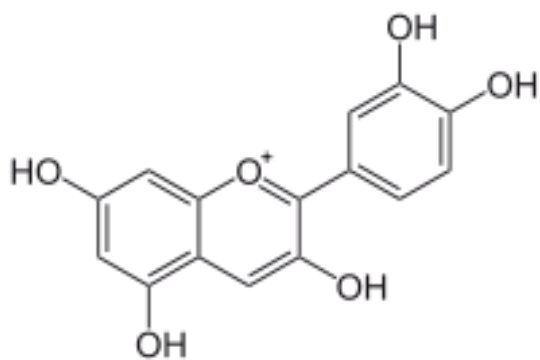
(Michlovský, 2014)

V přírodě se vyskytuje asi 17 antokyanidinů, ale jen šest z nich - kyanidin, delphinidin, petunidin, peonidin, pelargonidin a malvidin – jsou všudypřítomně distribuovány. (Ronald L. Prior, 2012)

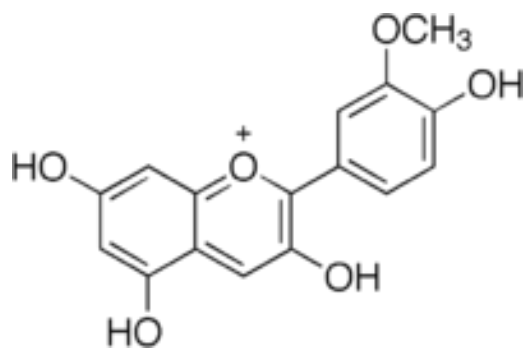
V bobuli kyanidin a delphinidin jsou vytvářeny ihned zpočátku, jejich koncentrace se na konci dozrávání snižuje o 10 %. Petunidin tvoří cca 10 % celkových antokyanů v době sklizně, na konci dozrávání dochází k nevýznamnému poklesu. Peonidin a malvidin se tvoří jako poslední a jejich přítomnost signalizuje biologickou aktivitu révy. (Michlovský, 2015)

Kromě pelargonidinu se ve víně vyskytují všechny antokyanidiny. (Michlovský, 2014) Malvidin je převládající antokyanidin ve většině červených vín a je barevně nejintenzivnější, tvoří základ barvy červených vín a modrých hroznů. Jeho koncentrace se liší podle odrůdy a stáří vína, pohybuje se od 100 mg.l⁻¹ do 1500 mg.l⁻¹ v průběhu fermentace, v několika dalších letech během zrání vína jeho obsah rychle klesá, kdy se může dostat na nízkou hodnotu 50 – 0 mg.l⁻¹. (Vachová, 2014)

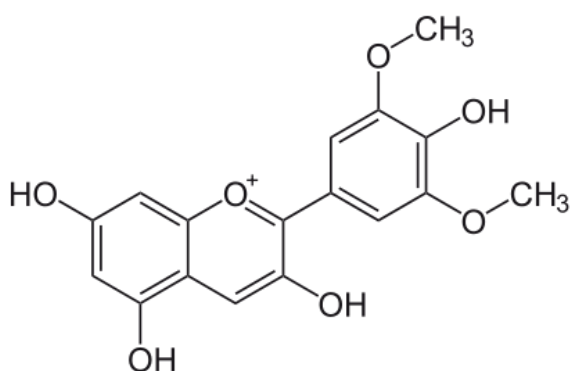
Další variantou antokyanových barviv, které se nachází ve víně, jsou estery jednotlivých monoglykosidů s kyselinou octovou, kumarovou a kávovou. (Pavloušek, 2011)



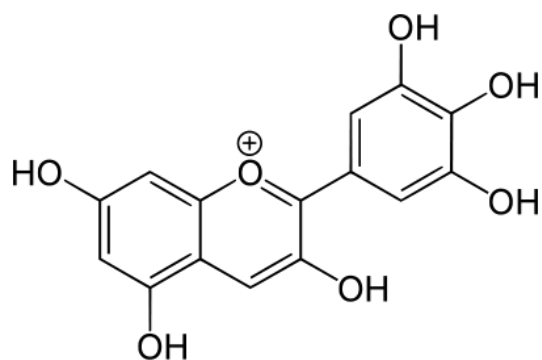
Obr. 3 Kyanidin



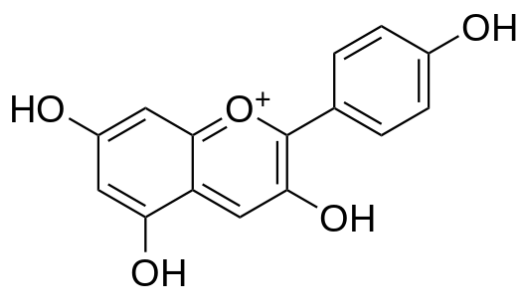
Obr. 4 Peonidin



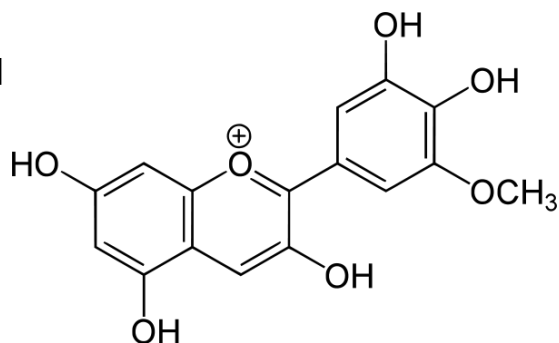
Obr. 5 Malvidin



Obr. 6 Delfinidin



Obr. 7 Pelargonidin



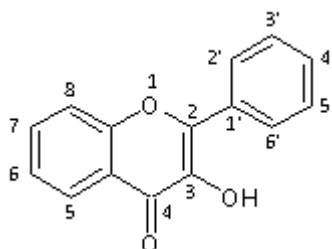
Obr. 8 Petunidin

Zdrojem kyanidinu a malvidinu jsou hrozny révy vinné, delfinidin je nejvíce zastoupeny ve višni, pelargonidin v malinách, peonidin a petunidin v modrých hroznech a jahodách.

(Robert J Nijveldt et al., 2001) Nejvíce je ve všech odrůdách révy vinné zastoupen malvidin (90 – 50 % přítomných antokyanů). (Ribéreau-Gayon et al., 2006)

3.2.2 Flavonoly

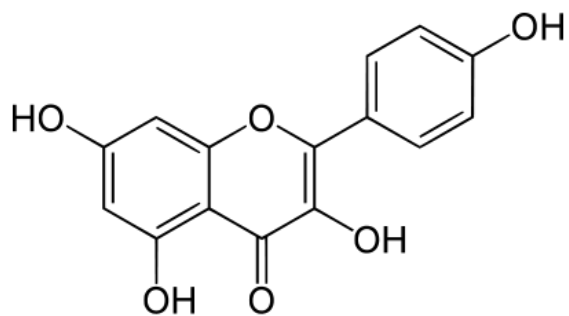
Jsou nejrozšířenější sloučeniny, žluté pigmenty s různou intenzitou barviva, které se vyskytují ve slupkách modrých a bílých hroznů, mohou se nacházet v třepině. (Michlovský, 2014)



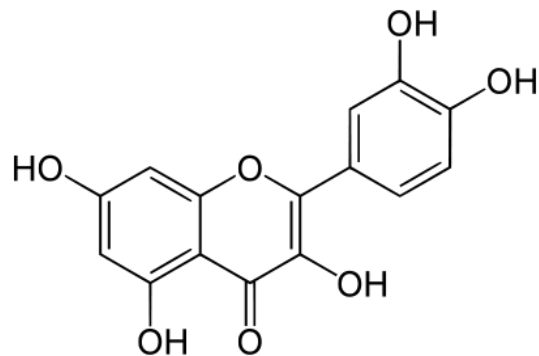
Obr. 9 Schéma flavonolů

Na rozdíl od většiny fenolových látek, jejich podíl je dán geneticky. (Michlovský, 2015) Flavonoly se vždy vyskytují v podobě glykosidů a to zejména v bobulích révy vinné. Liší se substitucí postranního jádra, produkující kaempferol (1 OH), quercitin (2 OH) a myricetin (3 OH). (Pavloušek, 2011) Glykosidy myricetinu ve slupkách bílých hroznů schází. (Michlovský, 2014)

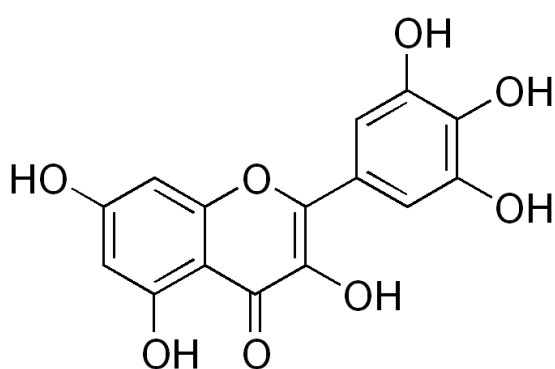
Glykosidy jsou během vinifikace rozloženy na cukerné jednotky a aglykon. V hotovém víně lze nalézt jen volné flavonolové aglykony; v bílých vínech v množství 1 – 3 mg.l⁻¹, ve vínech červených v množství v rozmezí 20 – 100 mg.l⁻¹. Flavonoly se nepodílejí na barvě bílých vín. (Michlovský, 2014) Mají schopnost chránit bobule před UV zářením. (Pavloušek, 2011)



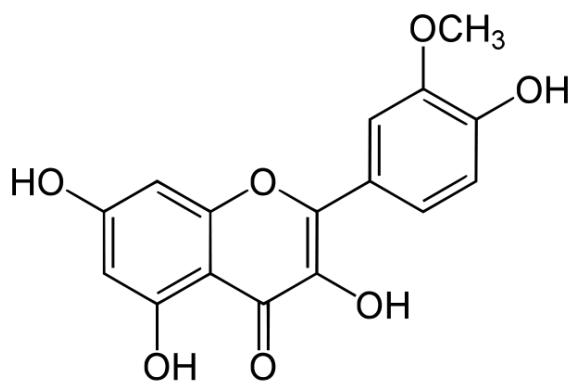
Obr. 10 Kaempferol



Obr. 11 Quercetin



Obr. 12 Myricetin



Obr. 13 Isorhamnetin

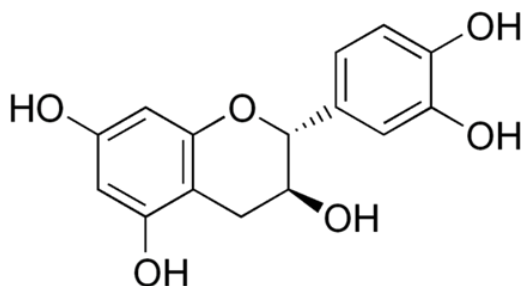
Kaempferol mimo révu vinnou lze identifikovat v brokolici, myricetin v slupkách ovoce, quercetin se nachází v hlávkovém salátu, olivách a cibuli. (Robert J Nijveldt et al., 2001)

3.2.3 Flavanoly

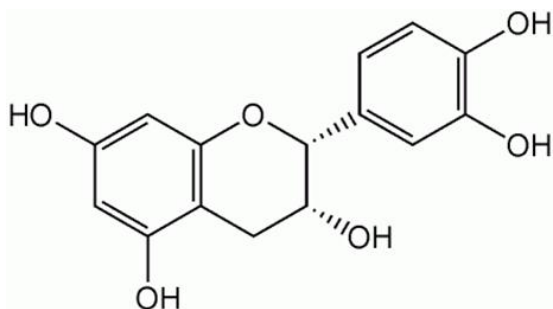
Flavan-3-oly jsou polymerizované katechiny, které se vyskytují v hroznech jako monomery, oligomery a polymery. (Véronique Cheynier, 2006) Během zrání vytvářejí v bobulí polymery nazvané proantokyanidiny (kondenzované taniny). (Pavloušek, 2011) V bobulích se nachází převážně v semenech a slupce, ačkoliv stopové množství monomerů a dimerů se nachází v dužnině, zejména u barvířek. (Véronique Cheynier, 2006) V bobulí mají největší zastoupení. Jejich množství je závislé na teplotě, proto v teplotně příznivých podmínkách je jich nejvíce, obzvláště u modrých odrůd. (Michlovský, 2015) Dále je jejich obsah závislý na stupni vývoje hroznů, na odrůdě a okolním prostředí. Ve slupce bobulí se syntetizují v průběhu dvou týdnů po odkvětu. (Downey et al., 2003)

Flavan-3-oly, ovlivňují strukturu a chuťové vlastnosti vína. Slupka a semeno obsahují jednoduché flavan-3-oly – katechin, epikatechin, epikatechin galát a epigallokatechin. (Pavloušek, 2011). V mladých červených vínech se nacházejí v množství kolem 50 – 100 mg.l⁻¹. (Michlovský, 2014)

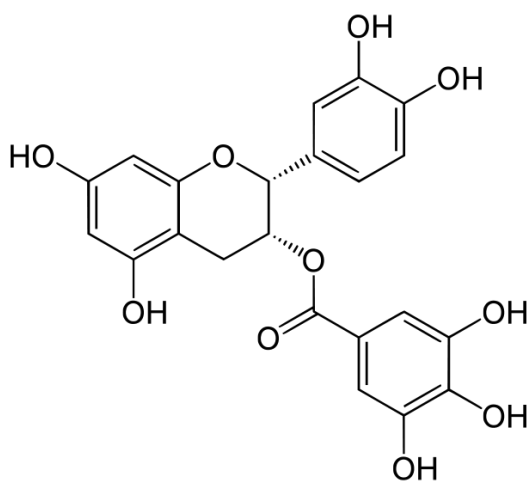
Množství katechinu a epikatechinu v červených vínech z Moravy a z Itálie zkoumali Baroň et al. (2012). Maximální koncentrace katechinu u odrůdy ‘Cabernet Sauvignon’ z Mikulova byla 112,4 mg.l⁻¹ a maximální koncentrace epikatechinu u odrůdy ‘Rulandské modré’ z Mikulova byla 91,2 mg.l⁻¹. Celková koncentrace flavanolů u vín z Moravy byla dva krát vyšší než u vín z Itálie, což mohlo být způsobeno chladnějším podnebím v České republice. (Michlovský, 2015)



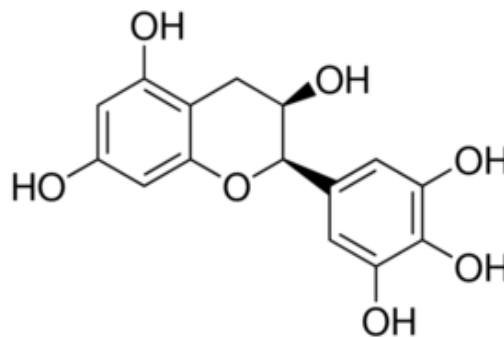
Obr. 14 Katechin



Obr. 15 Epikatechin



Obr. 16 Epikatechin galát



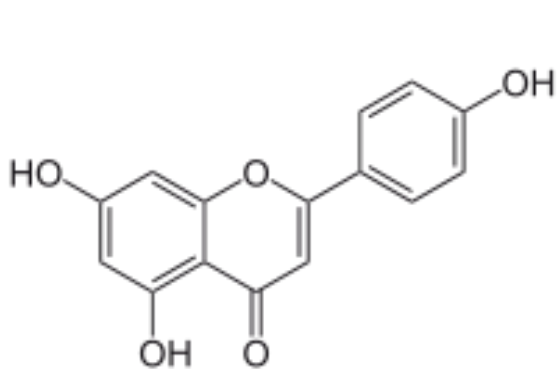
Obr. 17 Epigallokatechin

Katechin je nejrozšířenější z fenolických sloučenin, nachází se v červeném víně v koncentraci kolem 300 mg.l^{-1} , epikatechin v čaje a epikatechin galát v pohance a zeleném čaje. (Robert J Nijveldt et al., 2001)

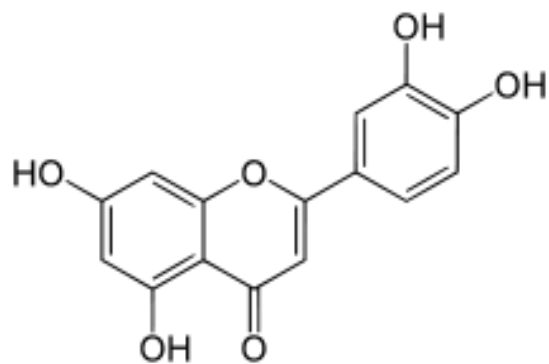
3.2.4 Flavony

Méně zastoupenou skupinou flavonoidních sloučenin, které můžeme najít ve víně, jsou flavony. Vznikají odvozením ze struktury flavonolů. Ve víně se nacházejí ve velmi malém množství a pocházejí ze slupek a listů révy vinné. (Michlovský, 2014)

Mezi flavony patří apigenin a luteolin. (Vachová, 2014)



Obr. 18 Apigenin



Obr. 19 Luteolin

Flavony se vyskytují v tymiánu, celeru, feferonkách a salátu. (Vachová, 2014)

3.3 Výskyt a role v rostlinách

V počátcích výzkumů byly flavonoidy považovány za metabolické odpadní produkty rostlin, ale dnes je jim přisuzováno hodně různých funkcí důležitých k růstu a vývoji rostlin. (Klejdus et al., 1999)

Flavonoidy zvyšují přitažlivost rostlin pro opylovače, navádí činnost půdních bakterií *Rhizobium sp.* při fixaci kyslíku. Zvyšují snášenlivost rostlin k různým abiotickým stresům. (Klejdus et al., 1999) Chrání rostlinu proti UV záření, slouží jako izolační materiály buněčných stěn při nepropustnosti pro vodu nebo plyny, a jako konstrukční materiály pro stabilitu rostlin. (Heldt et al., 2005) Flavonoidy jako biologické pigmenty poskytují zbarvení květinám, ovoci, zelenině a listům. Vytvářejí překážky proti plísním, mají vlastností antimikrobiální, insekticidní a estrogenní. To jsou některé z důvodů, proč rostliny vkládají takové významné množství své metabolické energie do jejich syntézy. (Andersen et al., 2006)

Hlavními zdroji flavonoidních sloučenin jsou především ovoce, zelenina a nápoje. Nevíce zastoupenými flavonoidy v ovoci jsou katechiny. Nejbohatším zdrojem katechinů jsou hrozny modrých odrůd révy vinné a jablka. Katechiny, flavonoly a proanthokyanidiny se vyskytují v plodech ovoce, především v dužnině. Ale například v jablkách jsou flavonoly obsaženy také ve slupce. Katechiny můžeme nalézt v hojném množství v peckovém ovoci, jako jsou modré švestky a meruňky. Flavanony a flavony se nacházejí v citrusových plodech, hlavně naringenin v grapefruitech a hesperetin v pomerančích, citronech a limetkách. Proto jsou také nazývány citrusovými flavonoidy. Proanthokyanidiny se ve velkém množství nacházejí v jablkách, švestkách a broskvích, třešních, ostružinách, černém rybízu, hroznech, mnohem méně jich je v jahodách a malinách. Kvercetin je nejčastějším flavonolem především v bezinkách a brusinkách. Obzvláště bohatým na obsah kaempferolu a myricetinu jsou rybíz a borůvky, pak slupky broskví a hrušek. (Andersen et al., 2006)

V zelenině se nachází velké množství flavonolů, a to hlavně kvercetin a kaempferol, v rajčatech, cibuli, šalotce, v brokolici, kapustě, zelí, v listové zelenině například v hlávkovém salátu

Nápoje, například ovocné šťávy, čaje a víno, mají vysokou koncentraci katechinů a flavonolů. Jablečná šťáva je jedním z nejbohatších zdrojů katechinů, brusinková šťáva obsahuje většinu flavonolů, především ve formě kvercetinů a myricetinů, zatímco flavanony se nacházejí v citrusových šťávách především z grapefruitů a pomerančů. V čaji nalezneme nejhojněji katechiny a flavonoly kvercetin, kaempferol a myricetin. Víno obsahuje komplexní směs katechinů, flavonolů, flavanonů a prokyanidinů. V pivu dominují především prokyanidiny. (Andersen et al., 2006)

Ovoce, zelenina, nápoje a další rostlinné produkty jsou hlavními zdroji fenolických, i flavonoidních sloučenin v lidské stravě. (Balasundram et al., 2006)

3.4 Vliv délky a způsobu macerace na obsah polyfenolických sloučenin

Velmi zásadní vliv na množství a složení polyfenolických sloučenin, zejména barviv a taninů, má délka a způsob macerace. Rozlišujeme několik druhů macerace:

- 1) Klasická macerace
- 2) Thermoflash / tepelná macerace
- 3) Karbonická macerace
- 4) Kryomacerace / studená macerace

(<http://www.ekovin.cz/ekovin/sekce-ekologicke-produkce/macerace>)

3.4.1 Klasická macerace

Macerace je zodpovědná za vzhled, vůni a chuť, kterými se červené víno liší od vína bílého. Přináší antokyany a třísloviny, které ovlivňují barvu a strukturu vína. Přináší také vonné látky, dusíkaté sloučeniny, pektiny, minerální látky atd. (Michlovský, 2015)

Různé chemické sloučeniny pocházejí ze slupek, semen a třapin. Přičemž každý z těchto orgánů přináší chemicky a chuťově různé složky. Třapina poskytuje bylinné chutě a vůně, semena tvrdost a slupky přispívají jemnosti, avšak také dodávají vínům nekomplexní charakter. Proto například kombinace semen a slupek dodává vínům lepší harmonii a rovnováhu. (Michlovský, 2015)

3.4.2 Kryomacerace

Je to předfermentační macerace za studena, pomocí které se zvyšuje koncentrace aromatických látek. (Michlovský, 2015)

Účelem této metody je lepší vyluhování fenolových sloučenin resp. barviv a aromatických látek. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s odrůdou 'Rulandské modré', kde výsledná vína byla velmi jemná a ovocitá. (Michlovský, 2015)

Mezi výhody studené macerace oproti klasické maceraci patří ochrana rmutu před oxidací, octovatěním a neřízeným začátkem fermentace. V případě nastupující alkoholové

macerace přechází extrakce látek ve vodném roztoku v extrakci v roztoku alkoholovém. Dochází k uvolnění fenolických látek a v případě modrých odrůd k uvolnění antokyanů, které jsou zodpovědné za barvu červených vín. (Ribéreau - Gayon et al., 2006)

Technika kryomacerace spočívá v ochlazení hroznů na 0 – 5°C, a to několika způsoby jako například zchlazení suchým ledem, vstříkovaní kapalného oxidu uhličitého, použití chladicího boxu, chlazením v nerezovém tanku s dvojitým pláštěm, chlazením pomocí N₂ nebo chlazením pomocí tepelného výměníku, a udržování této teploty po dobu 5 – 15 dní. Teplotním šokem pak dochází k narušení buněk a k intenzivnímu uvolňování látek uložených ve slupce. Po ohřevu se vinifikace provádí klasickým způsobem. (Michlovský, 2015)

Při pokusu se používal suchý led, proto podrobněji bude popsán jenom tento způsob.

Suchý led je to oxid uhličitý v pevném skupenství. „ Označení suchý vychází z jeho fyzikálních vlastností. Po přidání k cílovému produktu přechází oxid uhličitý z pevné formy přímo do formy plynné, aniž by předcházela do kapalné fáze.“ Je dodáván v podobě bloků nebo pelet. Suchý led se musí skladovat při nízkých teplotách v tepelně odizolovaných uzavíratelných nádobách kvůli tomu, že se začíná odpařovat už při – 78, 5°C. „ Množství přidávaného suchého ledu se řídí konkrétními podmínkami a charakterem zpracovaného produktu. Dávka 800 g suchého ledu na 100 kg rmutu způsobí jeho ochlazení o 1°C.“ (Burg, Zemánek, 2014)

3.4.3 Teplota a čas

Největší vliv na průběh extrakce látek má teplota a čas. Míra extrakce je ve většině případů přímo úměrná těmto faktorům. Například krátká studená macerace minimalizuje extrakci flavonoidů. Míra extrakce také závisí na druhu extrahovaných látek. (Jackson, 2008)

Předfermentační macerace při nižších teplotách (vodný roztok) zvyšuje množství antokyanů a flavanolů vyluhovaných ze slupek a dužiny, zatímco postfermentační

macerace (alkoholový roztok) zvyšuje množství proantokyanidinů jako výsledek macerace ze semen. (Morreno-Arribas et al., 2009)

Nízké teploty macerace zvyšují koncentraci antokyanů a polyfenolických látek, což bylo prokázáno dvěma pokusy Gomez-Plaza et al. (2000), který maceroval rmut odrůdy Monastrell při teplotě 10°C po dobu 5 dní a pak v roce 2001 testoval různou délku macerace (4, 5, 10 dní). V obou pokusech bylo zjištěno, že macerace při 10°C po dobu 10 dní měla kladný vliv na koncentraci antokyanů. (Gomez-Plaza et al. 2000) K podobným závěrům dospěl také Gil-Munoz et al. (2009), který použil odrůdy Cabernet Sauvignon a Shiraz, které po dobu 7 dní maceroval při 10°C. Dále Alvarez et al. (2009), který použil odrůdu Tempranillo, které rmut po dobu 4 dní maceroval při 6 – 8°C.

Michlovský (2015) uvádí, že doba macerace ovlivňuje barevnou intenzitu vína tak, že nejprve roste a pak během 8 – 10 dní klesá. Vývoj celkových polyfenolických látek je rozdílný. Během první fáze je jejich růst velmi rychlý, pak je pomalejší. Extrakce fenolových látek z různých orgánů hroznu je rozdílná podle podmínek. Například antokyaniny ze slupek se vyluhují jako první, protože nepotřebují přítomnost etanolu na rozdíl od tříslovin, které potřebují vyšší koncentraci alkoholu.

4. Experimentální část

Cílem experimentální části diplomové práce je porovnání vín z odrůdy 'Rulandské modré' v průběhu celého maceračního procesu, včetně postfermentační macerace. Vína byla vyrobena dvěma způsoby macerace, a to klasickou macerací a kryomacerací při teplotě 4 – 5°C po dobu 3, 7 a 14 dní.

4.1 Materiál

4.1.1 Popis odrůdy Rulandské modré

Je to velmi stará odrůda. Patří mezi špičkové odrůdy v kategorii modrých moštových odrůd. Pochází z Francie, kde se v Burgundské oblasti pěstuje od 4. století. Pěstuje se také v oblasti Champagne. Vzniklá křížením odrůd Tramín červený a Mlynářka. Do Státní odrůdové knihy byla zapsaná v roce 1941 jako Burgundské modré, v roce 1993 došlo ke změně názvu na Rulandské modré. (Sotolář, 2006)

Morfologie odrůdy:

List je malý až středně velký, nejčastěji okrouhlý, na spodní straně hladký, obvykle 5 laločnatý. Hrozen je malý až středně velký, uzavřený, připomínající šišku, odtud název Pinot. Je hustý až velmi hustý. Bobule je malá, kulatá, barva je tmavě modrá až černá. (Pavloušek, 2007)

Požadavky na stanoviště:

Rulandské modré má vysoké požadavky na polohu. Nejlepší jsou jižní, svahovité pozemky s dostatečným osluněním. Není vhodná do horších svahovitých a rovinatých poloh. Víno dosahuje vysoké kvality především ve vynikajících „terroir“. Kvalitní terroir zabezpečuje velmi kvalitní antokyaninovou a fenolickou zralost. Půdy vyžaduje teplé, záhřevné šterkovité a kypré nebo hlinitopísčité. Nesnáší půdy vlhké ani příliš suché. V těžkých půdách dobře plodí, ale má nízkou intenzitu barvy. (Pavloušek, 2007)

Zrání:

Odrůda začíná kvést v první a druhé dekádě června. Zaměkání bobulí začíná v první dekádě srpna. Rulandské modré dozrává nejčastěji v průběhu října. Velmi pozitivně působí na zralost hroznů slunečné a teplé podzimní počasí. Semena se většinou vybarví až do černa a mají neutrální až slabě nasládlou chuť. Slupka taktéž dosahuje velmi kvalitní fenolické zralosti, kdy nejsou patrné hořké a trpké tóny. Základem kvality budoucího vína je vysoká cukernatost, která slouží jako předpoklad vyššího obsahu alkoholu a fenolická zralost hroznů ve smyslu antokyaninové a taninové zralosti. (Pavloušek, 2007)

Odolnost k biotickým a abiotickým faktorům:

Odolnost k zimním mrazům je střední. Vyznačuje se střední až nižší odolnost k plísni révy a padlí révy. Odrůda je středně odolná k suchu. Velmi dobře snáší vyšší obsah vápníku v půdě. (Pavloušek, 2007)

Zelené práce:

Většinou postačuje regulace násady s využitím zimního řezu. U odrůdy má velký význam odlistění zóny hroznů jako možnost nepřímého boje proti padlí a hnilobám na hroznech. Kvalitní oslunění velmi pozitivně působí na obsah antokyaninových barviv ve slupce a na fenolickou zralost semen. (Pavloušek, 2007)

Využití odrůdy:

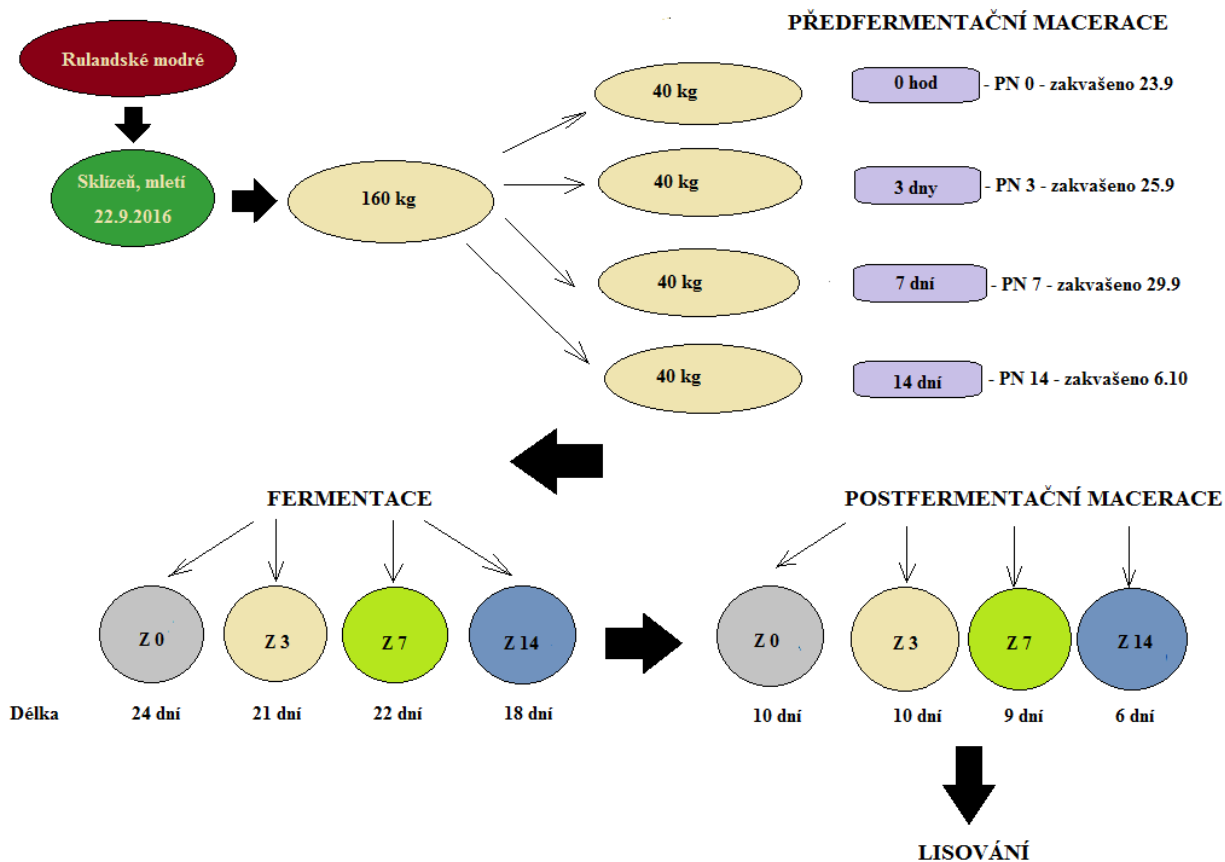
Odrůda je určena především na výrobu vysoce kvalitních přívlastkových vín. Dobrá cukernatost a fenolická zralost jsou vhodné pro výrobu vína metodou dlouhé macerace. U kvalitních hroznů optimální délka macerace je 21 dnů. Rulandské modré má geneticky daný nižší obsah antokyaninových barviv. Na základě složení antokyaninových barviv je možné poměrně jednoduchým způsobem odhalit falšování vína z této odrůdy. (Pavloušek, 2007) Víno je bledě rubínové až cihlově červené barvy. Má větší množství kyselin. Ve vůni lze vysledovat jahody, třešně a sušené švestky. (Sotolář, 2006)

4.1.2 Charakteristika stanoviště

Hrozny pocházejí z vinice Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně, která se nachází v obci Lednice, v Mikulovské vinařské podoblasti.

Vinohrady se nacházejí v nadmořské výšce 176 m n. m. Půdy jsou tady hlinité až hlinitopísčité. Je to oblast teplá, s průměrnou roční teplotou 9°C a ve vegetačním období 15,5°C. Průměrný roční úhrn srážek činí 516 mm. Pozemek je mírně svažité a orientovaný na jihozápad. (Sedláček, 2015)

4.2 Metodika práce



Obr. 20 Schéma experimentu

K založení experimentu byla použita odrůda ‘Rulandské modré’ z vinohradu Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně. Sklizeň probíhala ručně dne 22. 9. 2016. Hrozny byly téhož dne pomlety. Na pokus se použilo 160 kilogramů hroznů, které následně byly rozděleny do čtyř variant po 40 kilogramech. Základní analytický rozbor moštu ukazuje tabulka č. 1.

Cukernatost	20°NM
pH	3,28
Kyseliny	9,7 g.l ⁻¹
YAN	261 mg.l ⁻¹

Tab. 1 Rozbor moštu

Zkratky PN 0, 3, 7, 14 znamenají název odrůdy ‘Pinot noir’ (‘Rulandské modré’) a počet dní předfermentační macerace.

První varianta (PN 0) byla 23. 9. inokulována kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*, pod obchodní značkou Oenoferm Rouge a do každé z dalších třech variant (PN 3, PN 7, PN 14) bylo přidáno 6,6 kilogramů suchého ledu, který zchlادil rmut na 4 – 5°C, aby nedošlo k rozkvašení a mohla proběhnout naplánovaná předfermentační macerace.

Varianta PN 3 byla zakvašena 25. 9., varianta PN 7 – 29. 9. a varianta PN 14 – 6. 10.

Nejdéle kvasila varianta PN 0 – 24 dní a nejrychleji prokvasila varianta PN 14 – 18 dní.

Po ukončení fermentace následovala postfermentační macerace po dobu 6 až 10 dní (viz schéma). Lisování proběhlo 27. 10.

V průběhu celého měsíce se odebíraly vzorky každý druhý den z každé varianty pro laboratorní analýzu.

4.3 Metody

Měření se prováděly v laboratoři ústavu vinohradnictví a vinařství ZF MENDELU v Lednici. Byly použity analytické a spektrofotometrické metody.

Jednotlivá spektrofotometrická stanovení byla provedena na automatickém biochemickém analyzátoru MIURA ONE (I.S.E. S.r.l.; Guidonia (RM) – Itálie). Vína byla před stanovením jednotlivých parametrů odstředěna, pět krát zředěna ředicím pufrem o složení: 40 mM kyselina vinná, 40 mM octan sodný; 12 % ethanolu. Metody byly uzpůsobeny použitému analyzátoru, kdy inkubace probíhá při 37°C a inkubační doby je třeba přizpůsobit pracovním cyklům přístroje.



Obr. 21 Příklad přístroje MIURA ONE

4.3.1 Stanovení cukernatosti refraktometrem

Princip: Refraktometr je přístroj určený pro stanovení obsahu cukru v moštu na základě měření indexu lomu světla. (Balík, 2011)

Přístroje a pomůcky: Kapesní digitální refraktometr PAL firmy ATAGO.

Chemikálie a roztoky: Destilovaná voda.

Postup: Na začátek se na čidlo dává kapka destilované vody, aby se přístroj nakalibroval. Pak se na čidlo může kápnout měřený mošt. Po zmáčknutí tlačítka start se na displeji zobrazí hodnota v stupnicích Brix.

4.3.2 Stanovení pH

Princip: Hodnota pH je jedním z nejdůležitějších parametrů moštů a vína. Je to záporný dekadický logaritmus aktivity vodíkových kationtů v moště nebo ve víně. Stanovuje se na základě měření potenciálu skleněné elektrody, jenž závisí od aktivity vodíkových kationtů, vzhledem k referenční kalomelové elektrodě vhodným milivoltmetrem (pH-metrem), kalibrovaným tlumivými roztoky o známém pH. (Balík, 2011)

Přístroje a pomůcky: pH – metr, kalomelová, skleněná a platinová elektroda.

Chemikálie a roztoky: Tlumivé roztoky o známém pH.

Postup: Příprava tlumivých roztoku a kalibrace pH – metru se provádí podle doporučení výrobce. Kádinka se naplní moštem nebo vínem tak, aby elektroda byla ponořena. Obvykle stáčí 25 ml. Hodnota se odečítá až po ustálení na digitálním displeji. Přístroj měří s přesností na dvě desetinná místa.

4.3.3 Stanovení veškerých titrovatelných kyselin

Princip: Veškerými titrovatelnými kyselinami (veškerou kyselostí vína) se rozumí suma sloučenin titrovatelných odměrným alkalickým roztokem do pH 7. Kyselina uhličitá se do veškeré kyselosti nezahrnuje. (Balík, 2011)

Přístroje a pomůcky: Automatický titrátor „TitroLine easy“, magnetická míchačka, kombinovaná pH – elektroda, kádinka o objemu 50 až 100 ml.

Chemikálie a roztoky: 0,1 mol.l⁻¹ roztok NaOH, uchovávací roztok na elektrodu

Postup: Do 50 ml kádinky se odměří 10 ml vzorku a 10 ml destilované vody. Koncová hodnota pH se nastaví na 7. Do kádinky s připraveným roztokem se vloží magnetické míchadlo, pak se kádinka umístí na elektrickou míchačku, do ní se vloží dávkovač NaOH a elektroda. Po ustálení pH se zmáčkne start. Po ukončení titrace se na displeji zobrazí spotřeba NaOH, která se má přepočítat na gramy titrovatelných kyselin na litr pomocí následujícího vztahu:

$$x = a \times f \times 0,75$$

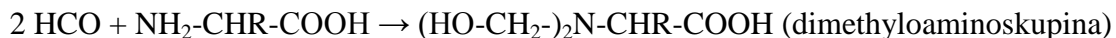
x....g.l⁻¹ veškerých titrovatelných kyselin

a....spotřeba NaOH v ml

f....faktor NaOH

4.3.4. Stanovení celkového asimilovatelného dusíku

Princip: Aminokyseliny mají amfoterní povahu, proto se nemůže použít k jejich stanovení běžné acidimetrické nebo alkalimetrické titrace. Aminoskupinu však lze zablokovat, např. reakcí s formaldehydem:



Poté se uplatní kyselý charakter karboxylové skupiny. Takto modifikované aminokyseliny se můžou titrovat hydroxidy. (Průšová, 2016)

Přístroje a pomůcky: Automatický titrátor „TitroLine easy“, magnetická míchačka, kombinovaná pH – elektroda, kádinka o objemu 50 až 100 ml.

Chemikálie a roztoky: 0,1 mol.l⁻¹ roztok NaOH, uchovávací roztok na elektrodu, 36 – 38 % roztok formaldehydu.

Postup: Měření celkového asimilovatelného dusíku navazuje na stanovení veškerých titrovatelných kyselin, kdy po ukončení měření titrovatelných kyselin se do vzorku přidá roztok formaldehydu, počká se na ustálení pH, pak se zmáčkne tlačítko start. Po ukončení titrace se na displeji zobrazí spotřeba roztoku NaOH v ml. Pro zjištění množství asimilovatelného dusíku se používá následující vztah:

$$x = a \times 140 \times f$$

x....mg.l⁻¹ asimilovatelného dusíku

a....spotřeba NaOH v ml

f....faktor NaOH

4.3.5 Stanovení obsahu vybraných flavonoidů pomocí HPLC

Princip: Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) je nejčastěji používaná separační metoda. Je vhodná pro dělení organických méně těkavých kapalných a tuhých látek, které jsou rozpustné ve vodě, organických rozpouštědlech nebo zředěných kyselinách. Je založená na separaci analytů na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází, která je vždy kapalná. Stacionární fáze je zakotvená v chromatografické koloně.

(<http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx>)

Přístroje a pomůcky: Vysokoučinný kapalinový chromatograf.

Chemikálie a roztoky: Silikagel, voda, organická rozpouštědla.

Postup: Vzorke dávkovány dávkovacím ventilem do mobilní fáze. Ta unáší jednotlivé složky vzorku na kolonu, kde dochází k opakovanému ustanovení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází a k separaci analytů dle fyzikálně – chemických vlastností. Po průchodu separační kolonou jsou analyty v mobilní fázi detekovány v průtokové cele detektoru. Měřenou veličinou je fluorescence, absorbance, index lomu, elektrická vodivost. Výstupem z detektoru je grafický záznam závislosti odezvy detektoru na retenčním čase, tj. chromatogram, na němž se hodnotí plocha nebo výška píku. Kvantitativní analýza se provádí na principu odečtení výsledku z kalibrační křivky.

4.3.6 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Pro stanovení celkové antioxidační aktivity analyzovaných vzorků vín se používají dvě rozdílné metody. Principem první metody, a to metody DPPH, je hodnocení inaktivace volných radikálů prostřednictvím antioxidantů přítomných ve víně. Principem metody FRAP je hodnocení redukční schopnosti antioxidantů obsažených ve víně.

1. FRAP – stanovení redukční síly.

Přístroje a pomůcky: Automatický biochemický analyzátor MIURA ONE.

Chemikálie a roztoky: Základní pufr obsahující octan sodný, roztok FeCl_3 , TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazin), HCl, standard kyseliny gallové.

Postup: K 198 μl základního pufru obsahujícího 200 mM octanu sodného upraveného kyselinou octovou na hodnotu pH 3,6 bylo přidáno 12 μl vzorku, 20 μl roztoku 20 mM FeCl_3 a 20 μl 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazin) v 40 mM HCl. Po 600 sekundách byla změřena absorbance při 620 nm. Redukční síla byla vypočítána z kalibrační křivky za použití kyseliny gallové (GA; 10 – 300 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) jako standardu. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ekvivalentů kyseliny gallové. (Pulido et al.,2000)

2. DPPH – stanovení antiradikálové aktivity.

Přístroje a pomůcky: Automatický biochemický analyzátor MIURA ONE.

Chemikálie a roztoky: Roztok DPPH (2,2-difenyl- β -pikrylhydrazyl) v methanolu, standard kyseliny gallové.

Postup: K 268 μ l roztoku DPPH v methanolu (300 mM) bylo přidáno 12 μ l vzorku, absorbance při 520 nm byla změřena po 360 sekundách a odečtena od absorbance měřené v čase 0. Antiradikálová aktivita byla stanovena na základě kalibrační křivky, za použití kyseliny gallové (GA; 10 – 300 mg.l^{-1}) jak standardu. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě mg.l^{-1} ekvivalentů kyseliny gallové. (Arnous et al., 2001)

4.3.7 Stanovení obsahu celkových fenolických sloučenin

Princip: Pro stanovení obsahu celkových fenolických sloučenin byla použita fotometrická metoda s Folin Ciocalteuovým činidlem a standardem kyseliny gallové. Metoda spočívá v oxidaci nebo redukci fenolových látek při reakci s Folin Ciocalteuovým činidlem, které se skládá s wolframu sodného, kyseliny orthofosforečné, kyseliny chlorovodíkové, molybdenanu sodného, síranu lithného a bromu. (Szarowska, 2012)

Přístroje a pomůcky: Automatický biochemický analyzátor MIURA ONE.

Chemikálie a roztoky: Folin-Ciocalteuovo činidlo, standard kyseliny gallové, destilovaná voda, 20 % roztok dekahydrátu uhličitánu sodného.

Postup: K 198 μ l vody bylo přidáno 12 μ l vzorku a 10 μ l Folin Ciocalteu činidla. Po 36 sekundách bylo přidáno 30 μ l 20 % roztoku dekahydrátu uhličitánu sodného. Absorbance při 700 nm byla měřena po 600 sekundách. Koncentrace celkových fenolů byla na základě kalibrační křivky za použití kyseliny gallové jako standardu (25 – 1000 mg.l^{-1}). Výsledky jsou vyjádřeny ve formě mg.l^{-1} ekvivalentů kyseliny gallové. (Waterman, 1994)

4.3.8 Stanovení celkových antokyanů

Přístroje a pomůcky: Automatický biochemický analyzátor MIURA ONE

Chemikálie a roztoky: Roztok 1,1 M HCl, roztok 0,1 M $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ s 0,2 M kyselinou citronovou.

Postup: Měření bylo provedeno SO₂ metodou. Bylo použito diferenciální měření mezi dvěma činidly. Objem vzorku 30 µl, objem činidla 220 µl. Činidlo 1 bylo 1,1 M HCl. Činidlo 2 bylo 0,1 M K₂S₂O₅ s 0,2 M kyselinou citronovou (SO₂). Po 600 sekundách inkubace byly změřeny absorbance při 520 nm. (Somers et al., 1977, Zoecklein et al., 1990)

Výpočty: Celkové anthokyany (mg.l⁻¹) = 166,7 * [A(HCl)520 – (5/3)*A(SO₂)520]

4.3.9 Stanovení celkových flavanolů

Princip: Koncentrace celkových flavanolů byla stanovena pomocí metody založené na reakci s p-dimethylaminocinnamaldehydu (DMACA). Při této metodě na rozdíl od široce používané reakci s vanilinem nedochází k interferenci s anthokyaniny. Navíc poskytuje vyšší citlivost a selektivnost.

Přístroje a pomůcky: Automatický biochemický analyzátor MIURA ONE

Chemikálie a roztoky: 0,1 % DMACA, 300 mM HCl v MeOH

Postup: K 240 µl činidla (0,1 % DMACA a 300 mM HCl v MeOH) bylo přidáno 10 µl vzorku, doba reakce byla 600 sekund. Poté byla změřena absorbance při 620 nm. Koncentrace celkových flavanolů byla stanovena na základě kalibrační křivky za použití epikatechinu jako standardu (10 – 200 mg.l⁻¹). Výsledky jsou vyjádřeny ve formě mg.l⁻¹ ekvivalentů katechinu. (Li, Y.-G et al., 1996)

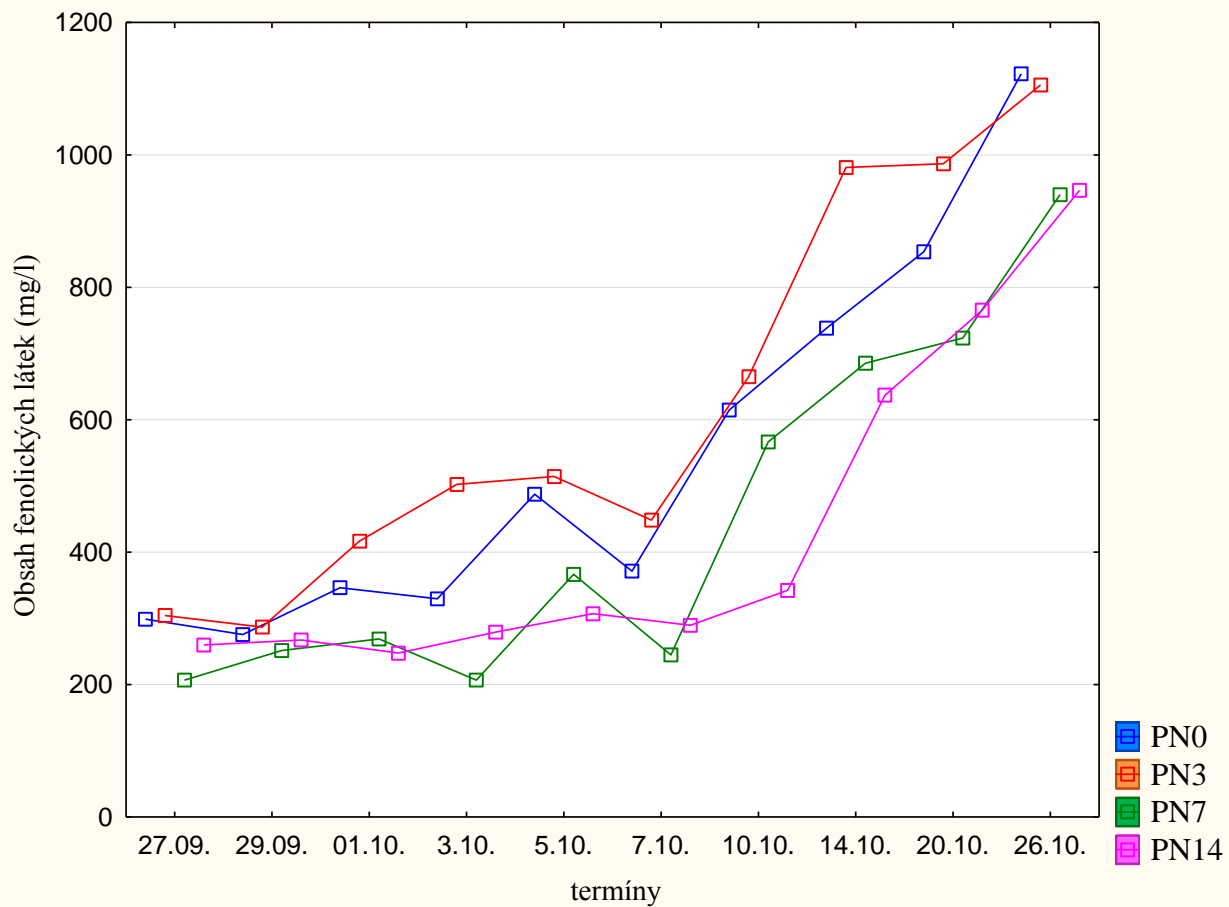
5. Výsledky

Jak již jsem uváděla, máme za úkol porovnat vína odrůdy ‘Rulandské modré’, které byly vyrobeny klasickou macerací a kryomacerací. Zjistit, jak ovlivňují tyto dva způsoby a celý macerační proces včetně postfermentační macerace obsah celkových fenolických látek, antioxidační aktivitu, skupiny flavonoidů (antokyany, flavanoly) a jednotlivé flavonoidy.

5.1 Stanovení obsahu celkových fenolických látek.

Graf číslo jedna vyjadřuje hodnoty celkových fenolů. Byl zaznamenán obdobný vývoj fenolů u variant PN 0 (klasická macerace) a PN 7 (sedmidenní kryomacerace), u kterých v průběhu fermentace došlo k menším poklesům a následně taky k růstu fenolů. Každopadně nejvyšší hodnoty fenolických látek má varianta PN 0 a nejnižší – varianta PN 7.

Můžeme s toho usoudit, že v našem případě klasická macerace poskytla větší koncentraci fenolických látek. Ale zároveň když se podíváme na graf, tak varianta PN 3 (třidenní kryomacerace) lišila se od varianty PN 0 jen nepatrně. A varianty PN 7 a PN 14 (čtrnáctidenní kryomacerace) také neměli nízké hodnoty. To znamená, že nemůžeme považovat kryomaceraci za neúčinný prostředek pro zvyšování obsahu fenolů. Navíc, je vidět, že k vysokým hodnotám fenolů významně přispěla i postfermentační macerace.

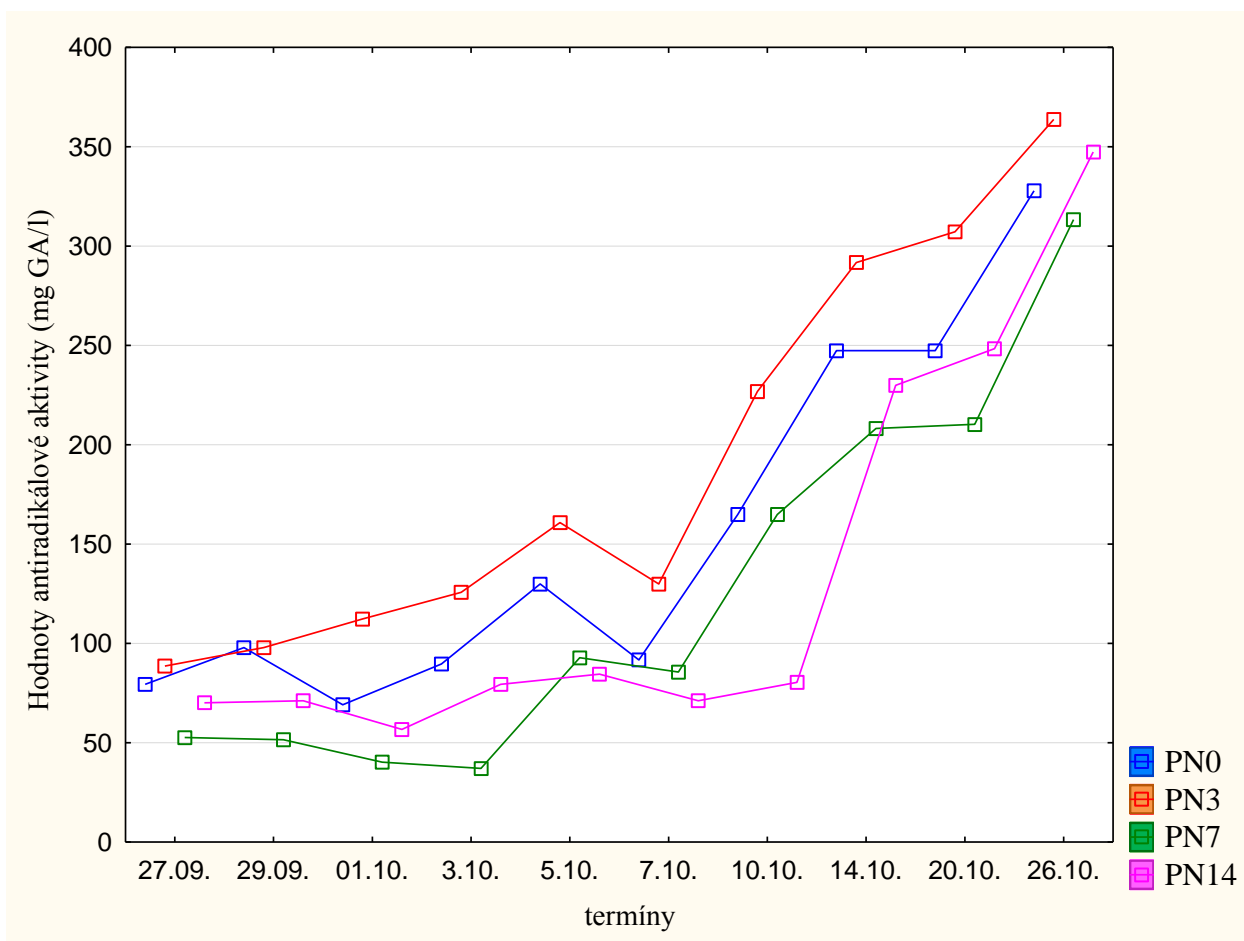


Graf 1: Vývoj celkových fenolů u všech variant macerace vyjádřeny jako mg.l^{-1} ekvivalentu kyseliny gallové

5.2 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Graf číslo dvě vyjadřuje hodnoty antiradikálové aktivity. Na grafu je jasně vidět, že nejvyšší hodnoty má varianta PN 3 (třidenní kryomacerace), následuje varianta PN 14 (čtrnáctidenní kryomacerace) a nejnižší hodnoty jsou u varianty PN 7 (sedmidenní kryomacerace).

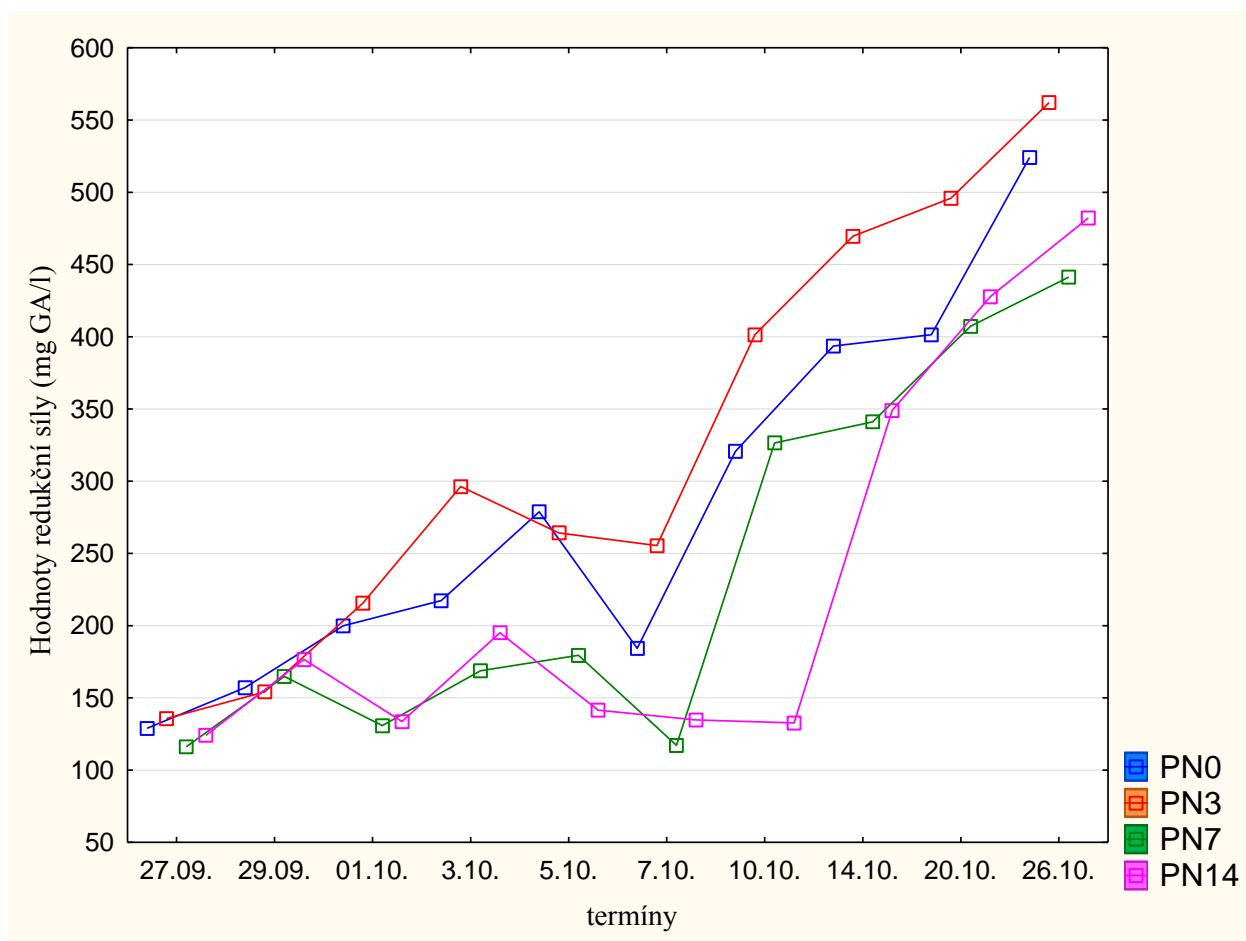
Z výsledku je jasné, že kryomacerace a postfermentační macerace pozitivně ovlivňují antiradikálovou aktivitu.



Graf 2: Hodnoty antiradikálové aktivity u všech variant macerace vyjádřeny jako mg.l^{-1} ekvivalentu kyseliny gallové

Graf číslo tři znázorňuje hodnoty redukční síly. Nejvyšší hodnoty má varianta s třídenní kryomacerací, následuje varianta bez kryomacerace a nejnižší hodnoty byly naměřeny u varianty se sedmidenní kryomacerací.

Znamená to, že se na vyšších hodnotách redukční síly může podílet jak klasická macerace, tak i kryomacerace.

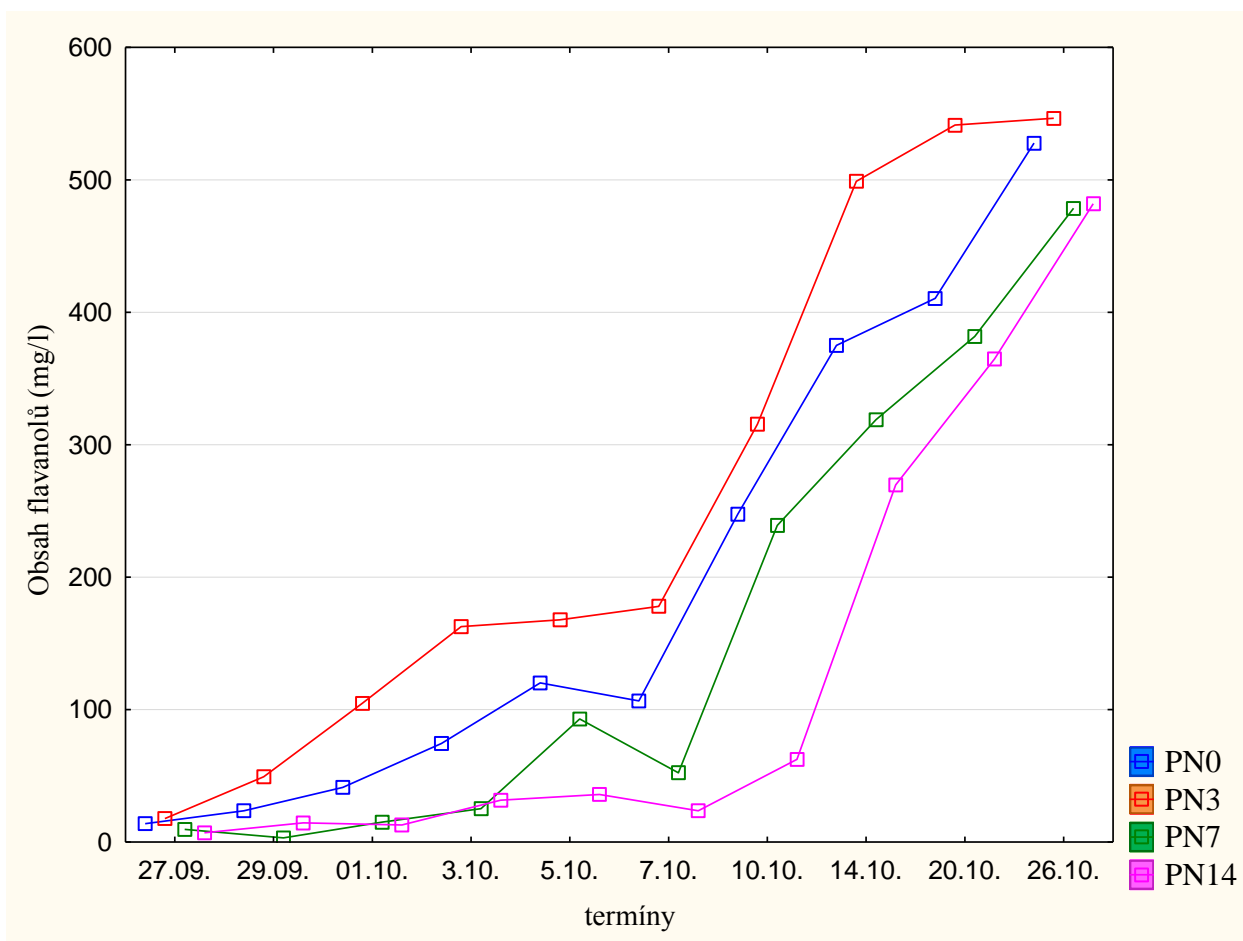


Graf 3: Hodnoty redukční síly u všech variant macerace vyjádřeny jako mg.l^{-1} ekvivalentu kyseliny gallové

5.3 Stanovení obsahu celkových flavanolů

V grafu číslo čtyři jsou znázorněny hodnoty celkových flavanolů. Z grafu je vidět, že obdobným vývojem prochází varianta PN 0 a varianta PN 3. Nejvyšší koncentrace flavanolů byla naměřena u varianty PN 3 a nejnižší – u varianty PN 7.

Z grafu můžeme usoudit, že se zase osvědčily oba dva způsoby macerace, jelikož i varianta bez kryomacerace dosáhla vysokých hodnot flavanolů. Nesmíme zapomenout i na postfermentační maceraci, v průběhu které se výrazně zvyšoval obsah flavanolů.

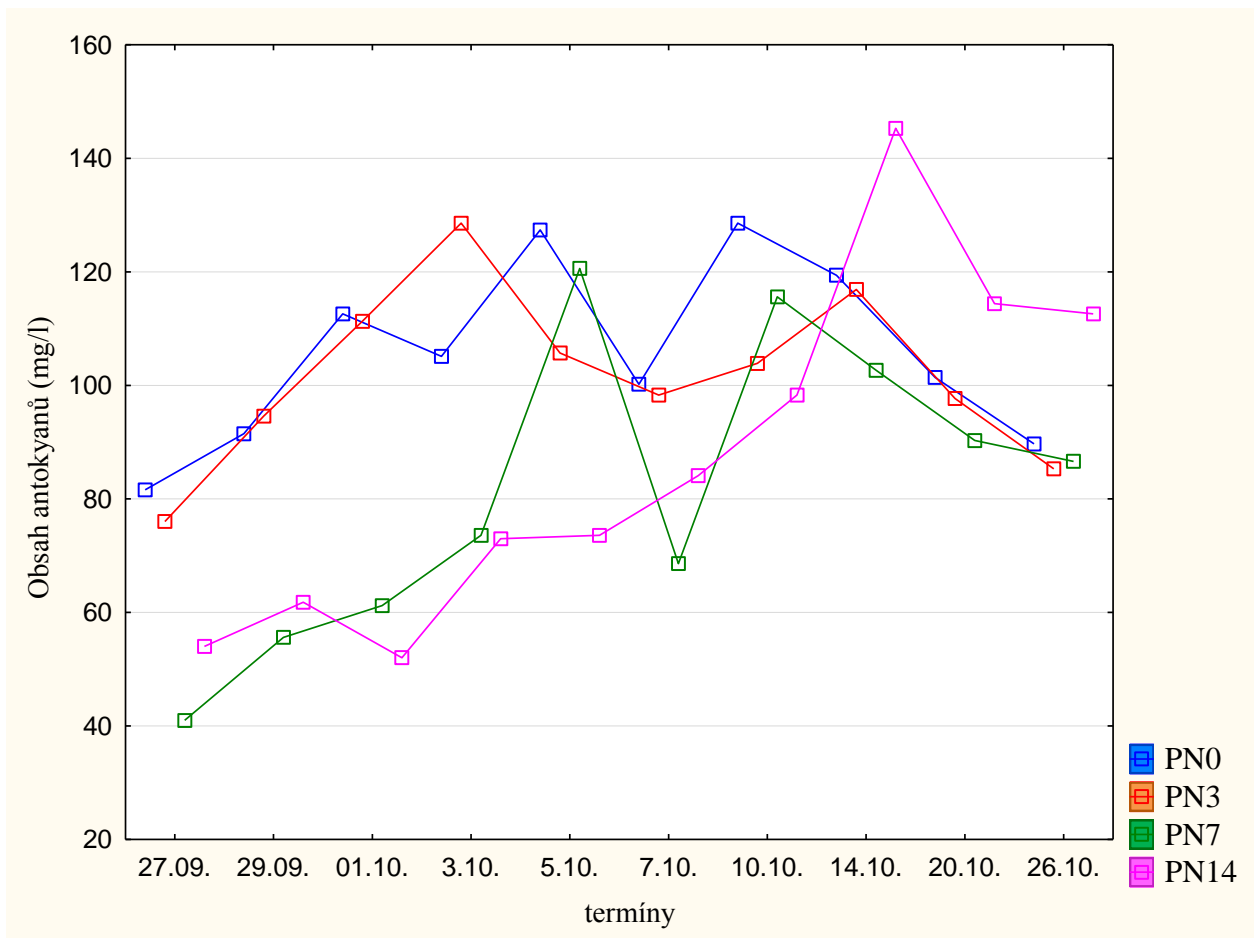


Graf 4: Vývoj celkových flavanolů u všech variant macerace vyjádřeny jako mg.l^{-1} ekvivalentu katechinu

5.4 Stanovení obsahu antokyanů

Graf číslo pět vyjadřuje hodnoty antokyanů u jednotlivých variant macerace. Z grafu je patrně, že ani u jedné varianty nebyl vývoj antokyanů rovnoměrný. Například u varianty PN 7 došlo v průběhu fermentace jak k výrazným vzrůstům obsahu antokyanu, tak i k velkým poklesům. Je vidět, že nejvyšší hodnoty dosáhla varianta PN 14 a nejnižší – varianta PN 3.

To nám ukazuje, že delší kryomacerace, v našem případě čtrnáctidenní, zvyšuje obsah antokyanů. Ale zároveň můžeme vidět, že v průběhu postfermentační macerace došlo k poklesu antokyanů u všech variant.



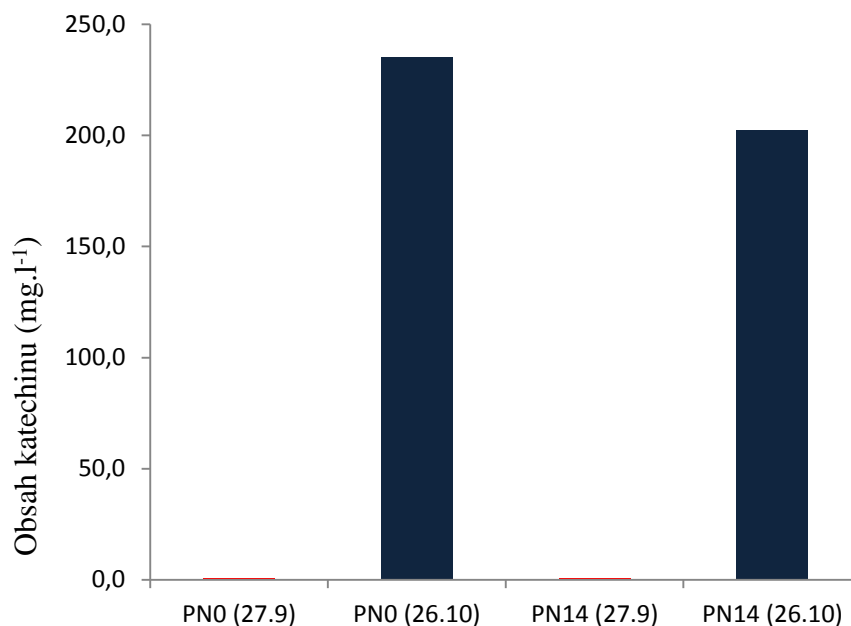
Graf 5: Vývoj antokyanů u všech variant macerace vyjádřeny jako mg.l^{-1}

5.6 Stanovení obsahu vybraných flavonoidů pomocí HPLC

Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byl stanoven obsah katechinu a epikatechinu u dvou variant macerace. U varianty PN 0 byly použity vzorky, které byly odebrány na začátku kvašení (27. 9.) a v průběhu postfermentační macerace (26. 10.). U varianty PN 14 – po pěti dnech předfermentační kryomacerace (27. 9.) a v průběhu postfermentační macerace (26. 10.).

Z grafu je vidět, že varianty bez kryomacerace a s čtrnáctidenní kryomacerací měly před zahájením fermentace velmi nízký obsah katechinu, který však rapidně vyrostl po fermentaci a absolvování postfermentační macerace, a varianta bez kryomacerace měla vyšší obsah katechinu.

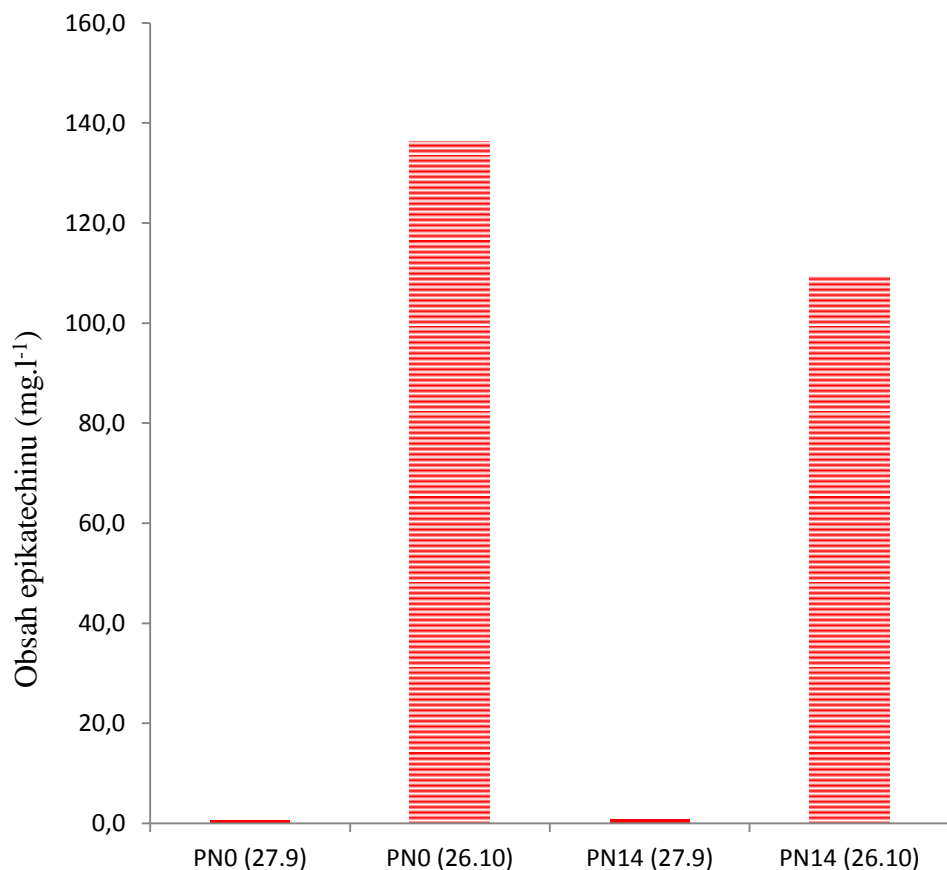
To nám ukazuje, že zvýšení koncentrace katechinu napomohl celý macerační proces a oba způsoby macerace.



Graf 6: Hodnoty katechinu u variant PN 0 a PN 14 vyjádřeny jako mg.l⁻¹

Podobně jako katechiny se vyvíjely i epikatechiny. Před začátkem fermentace byl jejich obsah u obou variant nízký, ale po prokvašení a postfermentační maceraci byl zaznamenán jejich velký růst.

Tady jsme došli ke stejnému závěru. Koncentraci epikatechinu pozitivně ovlivňují klasická macerace a kryomacerace, a také postfermentační macerace.

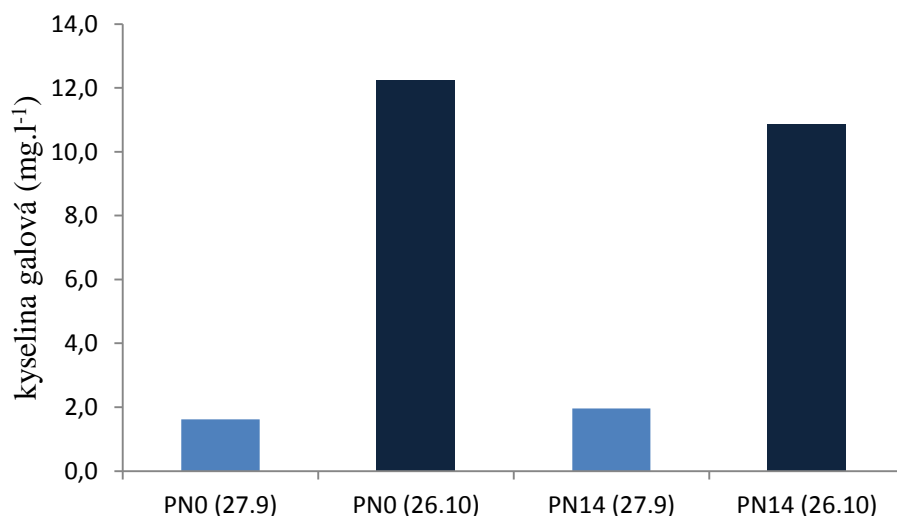


Graf 7: Hodnoty epikatechinu u variant PN 0 a PN 14 vyjádřeny jako mg.l⁻¹

5.7 Stanovení obsahu fenolových kyselin pomocí HPLC

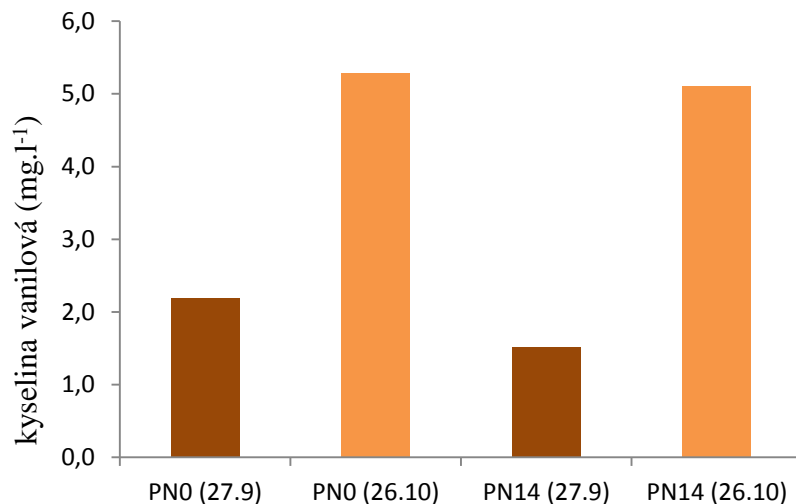
Pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie byl stanoven obsah některých fenolových kyselin resp. hydroxybenzoových kyselin - kyselina galová, kyselina protocatechuová, vanillová, syringová a kyselina hydroxybenzoová. U varianty PN 0 byly použity vzorky, které byly odebrány na začátku kvašení (27. 9.) a v průběhu postfermentační macerace (26. 10.). U varianty PN 14 – po pěti dnech předfermentační kryomacerace (27. 9.) a v průběhu postfermentační macerace (26. 10.).

Z grafu je patrně, že varianty PN 0 a PN 14 měly před zahájením fermentace nízkou koncentraci kyseliny galové, která stoupla po fermentaci a absolvování postfermentační macerace.

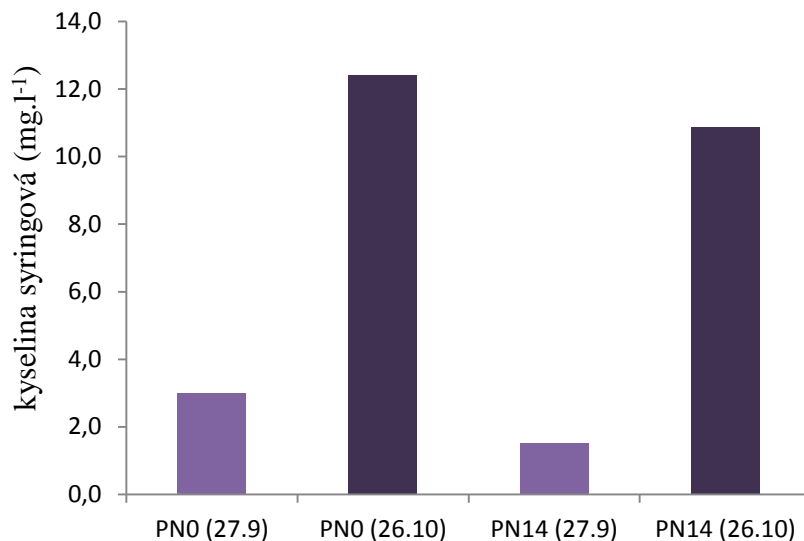


Graf 8: Hodnoty kyseliny galové u variant PN 0 a PN 14 vyjádřeny jako mg.l⁻¹

Vývoj kyseliny vanilové a kyseliny syringové se velmi podobá. Varianty PN 0 a PN 14 měly před zahájením fermentace koncentraci těchto dvou kyseliny nižší než po fermentaci a absolvování postfermentační macerace.

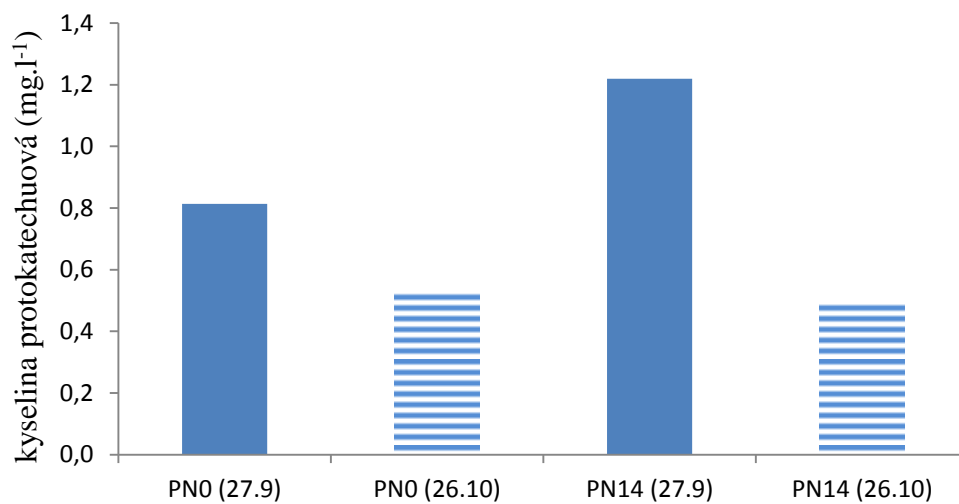


Graf 9: Hodnoty kyseliny vanilové u variant PN 0 a PN 14 vyjádřeny jako mg.l⁻¹



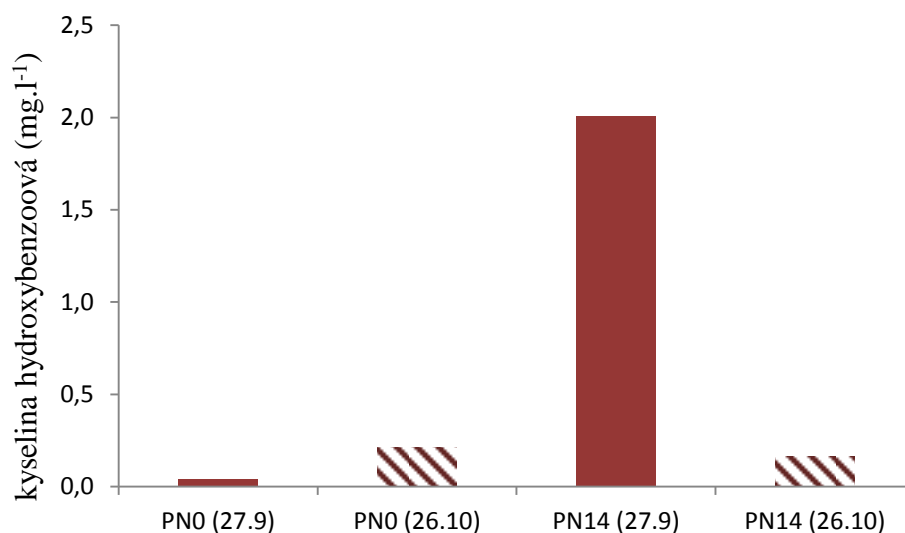
Graf 10: Hodnoty kyseliny syringové u variant PN 0 a PN 14 vyjádřeny jako mg.l⁻¹

Vývoj kyseliny protokatechuové probíhal jinak než u předchozích kyselin. Je vidět, že před zahájením fermentace její koncentrace byla naopak vyšší než na konci postfermentační macerace.



Graf 11: Hodnoty kyseliny protokatechuové u variant PN 0 a PN 14 vyjádřeny jako mg.l⁻¹

Poslední zkoumanou kyselinou byla kyselina hydroxybenzoová. Její vývoj byl zase odlišný od všech ostatních kyselin. U varianty PN 0 byl před začátkem kvašení její obsah velmi nízký, na konci postfermentační macerace nepatrně stoupl. Naopak u varianty PN 14 koncentrace kyseliny hydroxybenzoové před kvašením byla vysoká, avšak ke konci postfermentační macerace výrazně poklesla.



Graf 12: Hodnoty kyseliny hydroxybenzoové u variant PN 0 a PN 14 vyjádřeny jako mg.l⁻¹

6. Diskuze

Z provedených měření a z nich získaných hodnot, můžeme usoudit, že vína prošli očekávaným vývojem.

Podle dvou pokusů Gomez-Plaza et al. (2000, 2001) a Gil-Munoz et al. (2009) vína vyráběna s předfermentační kryomacerací mají mít vyšší obsah antokyanů. Ty dva pokusy se prováděly při teplotě 10°C s délkou macerace 4, 5, 10 dní. Můj pokus se prováděl při 5°C s délkou macerace 3, 7, 14 dní. Nicméně, tvrzení o růstu obsahu antokyanů se potvrdilo. Nejvyššího obsahu dosáhla varianta PN 14 - čtrnáctidenní předfermentační kryomacerace. Michlovský (2015) uvádí, že koncentraci antokyanů zvyšuje předfermentační macerace za nízkých teplot, ale zároveň, že po zahájení fermentace jejich obsah roste jen během prvních osmi dní, pak začíná klesat. To odpovídá tomu, co se dělo v mém pokusu. U všech variant v průběhu předfermentační macerace a několika dní fermentace koncentrace antokyanů se zvyšovala, pak došlo k několika menším a větším výkyvům, nakonec v průběhu postfermentační macerace jejich obsah začal klesat. S toho je možné odvodit, že postfermentační macerace nepomáhá zvýšení obsahu antokyanů.

Dalším sledovaným parametrem byl obsah celkových flavanolů. Podle Michlovského (2015) pomocí předfermentační kryomacerace se zvyšuje extrakce flavanolů z dužniny a slupky a postfermentační macerace zvyšuje koncentraci proantokyanidinů (taninů) ze semen, které také zařazujeme do flavanolů. To odpovídá naměřeným výsledkům, kde u třech variant s macerací při nízkých teplotách před kvašením a macerací po kvašení postupně se zvyšoval obsah flavanolů a zůstal přibližně na stejné úrovni. Nejvyšší koncentrace flavanolů byla naměřená u varianty s třídní předfermentační kryomacerací.

Do skupiny flavanolů také řadíme katechiny a epikatechiny. Podle Kovac et al. (1992) doba macerace a přítomnost semen a slupek v moštu vede k vínům s vyšším obsahem katechinů. To se potvrdilo u mého pokusu, kde větší koncentraci katechinů měla varianta PN 0 – bez předfermentační macerace, ale s delší postfermentační macerací. Zajímavé je, že varianta PN 14, která prošla čtrnáctidenní macerací před fermentací, měla nižší obsah katechinů.

Na základě získaných poznatků lze to vysvětlit tím, že katechiny ze semen se lépe extrahují v alkoholovém roztoku, kterým je víno po fermentaci. Francesca et al. (2014) uvádí, že obsah katechinu a epikatechinu v červeném víně, které absolvovalo delší postfermentační maceraci, se velmi liší od vína bez ní. Je ten obsah o hodně vyšší. To se potvrdilo i u mého experimentu. Varianta PN 0 – klasická macerace s 10 denní postfermentační macerací měla vyšší obsah katechinu a epikatechinu než varianta PN 14 – čtrnáctidenní kryomacerace s 6 denní postfermentační macerací. To znamená, že větší vliv na obsah těchto látek má macerace po fermentaci.

Dalším potvrzením výsledku týkajících se katechinů je práce Gambuti et al. (2004), který zkoumal vliv macerace na obsah katechinu a epikatechinu v červených vínech. Ohledně epikatechinu jsou naše práce v rozporu, jelikož jeho obsah v mém pokusu stejně jako katechinu rapidně vyrostl. A v práci Gambuti et al. (2004) naopak došlo k poklesu.

Sledovaným parametrem u vín a moštu byl také obsah celkových fenolických látek. Z výsledků získaných touto prací můžeme zjistit, že obsah fenolů stoupa u všech variant macerace. Ke stejnému tvrzení došli Kaspar (2013) a Michlovský (2015), který uvádí, že obsah většiny fenolů se zvětšuje již při předfermentační maceraci a na začátku kvašení, jako první se extrahují fenolové kyseliny, následují flavonoly a antokyany. V mém pokusu koncentrace fenolických látek se postupně zvětšovala až do konce postfermentační macerace, i když v průběhu kvašení došlo k menším poklesům. Zajímavostí je, že největší obsah fenolických látek byl u varianty PN 0 – bez předfermentační macerace za nízkých teplot. Vysvětlením může být to, že další tři varianty podstoupily kryomaceraci a za působení nízkých teplot došlo k vysrážení některých látek jako například antokyanů.

Michlovský (2015) a Arcari et al. (2012) poukázali na to, že existuje úzká závislost mezi obsahem celkových fenolických látek a antioxidační aktivitou. Toto tvrzení se v mém experimentu nepotvrdilo. Varianta s klasickou macerací měla nejvyšší obsah fenolů, ale s hodnotami antiradikálové aktivity a redukční síly byla na druhém až třetím místě. Zároveň varianta s třídenní kryomacerací měla nepatrně méně fenolů než varianta s klasickou macerací, a měla nejvyšší hodnoty redukční síly a antiradikálové aktivity.

7. Závěr

V diplomové práci se hlavně pojednává o fenolických látkách, větší pozornost se věnovala flavonoidům. Dál se tady rozebírá kryomacerace, její vliv na obsah fenolických látek a flavonoidů. Jsou zde shrnuty poznatky nejen o tom, jak se kryomacerace provádí, ale hlavně jestli je pro nás užitečná a v kterých směrech.

Kryomacerace je způsob výroby vína, při kterém se rmut ochlazuje na 5°C po dobu 5 – 15 dní pomocí například suchého ledu. Díky tomuto způsobu jsou vzniklá vína víc ovocná a výrazně aromatická, plná, svěží a strukturní. Výhodou je to, že stávají se pro konzumenty více lákavé. Nevýhodou je zase vyšší cena těchto vín. Dalším pozitivním účinkem kryomacerace je zvýšení obsahu fenolických látek a flavonoidů způsobené popraskáním buněk příslušným teplotním šokem, jak bylo zjištěno v experimentální části této diplomové práce a pracích dalších. Vyšší obsah fenolických látek ve víně je pro nás důležitý, protože jsou to zdraví prospěšné látky a zajišťují větší stabilitu vína.

V pokusu se potvrdilo, že delší doba kryomacerace pozitivně ovlivňuje obsah antokyanů, výrazně jeho zvyšuje. Dál se také potvrdilo, že díky studené maceraci se zvýšil obsah flavanolů. Také se zjistilo, že pro vývoj katechinu a epikatechinu kryomacerace není moc užitečná, koncentrace těchto látek se výrazně zvýšila při postfermentační maceraci. A v neposlední řadě se musí zmínit, že u všech variant, které absolvovali kryomaceraci, byl zaznamenán vyšší antioxidační potenciál.

V posledních letech získávají metody studené macerace víc a víc příznivců v řadách vinařů, nejen pro své výše uvedené výhody, ale i protože světový trh vína požaduje stále častěji hladká a ovocná červená vína.

8. Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá studiem flavonoidů v červených vínech. Práce je rozdělená na část literární a část experimentální. V literární části se popisují fenolické látky, větší pozornost je věnována flavonoidům, jakožto významným polyfenolickým látkám, které ovlivňují kvalitu červených vín. Dále se pak jednotlivé podkapitoly věnují maceraci resp. kryomaceraci. Cílem experimentální části diplomové práce bylo porovnání vín z odrůdy 'Rulandské modré'. Vína byla vyrobena dvěma způsoby macerace, a to klasickou macerací a kryomacerací při teplotě 4 – 5°C po dobu 3, 7 a 14 dní. Zároveň u těchto dvou způsobů byl sledován vliv postfermentační macerace. U vín byl zkoumán obsah fenolických látek, antokyanů, flavanolů, obsah katechinu, epikatechinu a antioxidační aktivita. Výsledkem je, že kryomacerace zvyšuje obsah antokyanů, celkových flavanolů a antioxidační kapacitu. Klasická macerace pozitivně ovlivnila obsah celkových fenolických látek a díky postfermentační maceraci se zvýšila koncentrace katechinu a epikatechinu. Pro červená vína se jeví kryomacerace jako žádoucí krok při výrobě.

Klíčová slova: fenolické látky, flavonoidy, červené víno, macerace, kryomacerace

9. Resumé

This diploma thesis deals with study of flavonoids in red wine. This dissertation is divided into two parts: theoretical and practical. Theoretical part is define phenolic compounds, pays attention to flavonoids as important polyphenols which influence quality of red wines. The particular subchapters pay attention to maceration, respectively cryomaceration. The aim of the experimental part of this diploma thesis was to compare wines from 'Pinot noir'. The wines were produced by two ways of maceration: fermentative maceration and cryomaceration at 4 – 5°C for 3, 7, 14 days. At the same time, the effect of post-fermentation maceration was monitored in these two ways too. For wines was investigated the content of phenolic compounds, anthocyanins, flavanols content of catechin, epicatechin and antioxidative activity. Fermentative maceration positively influenced the content of total phenolic substances and post-fermentation

maceration increased the catechin and epicatechin concentration. For red wines, cryomaceration appears to be a desirable step in production.

Keywords: phenolic compounds, flavonoids, red wine, maceration, cryomaceration

9. Seznam použité literatury

ALVAREZ, I.; ALEIXANDRE, J. L.; GARCIA, M. J.; LIZA-MA, V.; ALEIXANDRE-TUDO, J. L. 2009. Effect of the prefermentative addition of copigments on the polyphenolic composition of Tempranillo wines after malolactic fermentation. *European Food Research and Technology*. 2009. p. 501 – 510.

ANDERSEN, O. M. a MARKHAM K. R. 2006. *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Boca Raton, FL: CRC, Taylor. 2006. 1237 s. ISBN 08-493-2021-6.

ARCARI, S. G.; CHAVES, E. S., VANDERLINDE, R.; ROSIER, J. P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. 2013. Brazilian fortified wines: Chemical composition, chromatic properties and antioxidant activity. *Food Research International*. 2013. p. 164 – 173.

ARNOUS, A.; MARKIS, D.P.; KEFALAS, P. 2001. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001. p. 5736 – 5742.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM K.; SAMMAN S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 2006. p. 191 – 203.

BALÍK, J. 2011. *Vinařství: návody do laboratorních cvičení*. Dotisk. Mendelova univerzita v Brně. 2011. ISBN 978-80-7157-933-5.

BAROŇ, M.; KUMŠTA, M. 2012. Comparison of North Italian and South Moravian wines on the base of their antioxidant activity, phenolic composition and sensory quality. *Acta Universitatis Agriculturae et silviculturae mendeliana brunensis*. 2012.

BURG, P.; ZEMÁNEK, P. 2014. *Stroje a zařízení pro vinařství*. Olomouc: Agriprint. 2014. ISBN 978-80-87091-49-4.

CREASY, G. L.; CREASY L. L. 2003. Grape-derived wine flavonoids and stilbenes. In: SANDLER, Merton a Roger PINDER. *Wine: A Scientific Exploration*. London: Taylor & Francis. 2003. p. 199 – 227. ISBN 0-415-24734-9.

DOWNEY, M; HARVEY, J.; ROBINSON, S. 2003. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2003. p. 15 – 27.

EKOVÍN. 2015. Macerace. *Ekovín* [online] 2015. [cit. 20.11.2016]. Dostupné z: (<http://www.ekovin.cz/ekovin/sekce-ekologicke-produkce/macerace>).

FRANCESCA, N.; ROMANO, R.; SANNINO, C.; GROTTAGLIE, L. L.; SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. 2014. Evolution of microbiological and chemical parameters during red wine making with extended post-fermentation maceration. *International Journal of Food Microbiology*. 2014. p. 84 – 93.

GAMBUTI, A.; STROLLO, D.; UGLIANO, M.; LECCE, L.; MOLO, L. 2004. Trans-resveratrol, quercetin, catechin, and epicatechin content in South Italian monovarietal wines: relationship with maceration time and marc pressing during winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004. p. 5747 – 5751.

GIL-MUNOZ, R.; MORENO-PEREZ, A.; VILA-LOPEZ, R.; FERNAN-DEZ-FERNANDEZ, J. I.; MARTINEZ-CUTILLAS, A.; GOMEZ-PLAZA, E. 2009. Influence of low temperature prefermentative techniques on chromatic and phenolic characteristics of Syrah and Cabernet Sauvignon wines. *European Food Research and Technology*. 2009. p. 777 – 788.

GOMEZ-PLAZA, E.; GIL-MUNOZ, R.; LOPEZ-ROCA, J. M.; MARTINEZ, A. 2000. Color and Phenolic Compounds of a Young Red Wine. Influence of Wine-Making Techniques, Storage Temperature, and Length of Storage Time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000. p. 736 – 741.

HELDT, H. W.; HELDT, F. 2005. *Plant biochemistry*. 3rd Edition. Burlington: Elsevier Academic Press. 2005. 630 s. ISBN 0-12-088391-033.

CHEYNIER, V. 2006. Chapter 5: Flavonoids in Wine. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*. Taylor & Francis Group, LLC. 2006. p. 263 – 306.

JACKSON, R. S. 2008. *Wine science : principles, practice, perception*. 3rd Edition. San Diego: Academic Press. 2008. 654 s. ISBN: 978-0-12-373646-8.

KASPAR, A. *Vliv studené macerace na obsahové látky moštů révy vinné*. Lednice, 2013. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta.

KLEJDUS, B.; KUBÁŇ, V. 1999. Rostlinné fenoly v allelopatii. *Chemické listy* [online]. 1999. p. 243-248 [cit. 30.11.2016]. Dostupné z: (http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_04_243-248.pdf).

KOVAC, V.; ALONSO, E.; BOURZEIX, M.; REVILLA, E. 1992. Effect of several enological practices on the content of catechins and proanthocyanidins of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1992.

LABMET. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie. *Labmet* [online]. [cit. 24.04.2017]. Dostupné z: (<http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx>).

LI, Y.-G.; TANNER, G.; LARKIN, P. 1996. The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1996. p. 89 – 101.

MICHLOVSKÝ, M. 2014. *Lexikon chemického složení vína*. Radix, 2014. 262 s. ISBN 978-80-905319-2-5.

MICHLOVSKÝ, M. 2015. *Příprava červených vín*. Garamon s.r.o., Hradec Králové. 2015. 329 s. ISBN 978-80-905319-5-6.

MORENO-ARRIBAS, M.; POLO, M. 2009. *Wine chemistry and biochemistry*. New York: Springer. 2009. 735 s. ISBN 9780387741185.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; HOORN, D.; BOELEN, P. G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001. p. 418 – 425.

PAVLOUŠEK, P. 2011. *Pěstování révy vinné: moderní vinohradnictví*. Praha: Grada. 2011. ISBN 978-80-247-3314-2.

- PAVLOUŠEK, P. 2007. *Encyklopedie révy vinné*. Computer Press Brno. 2007. 320 s. ISBN: 978-80-251-1704.
- PRIOR, R. L. 2012. Chapter 3: Anthocyanins: Understanding Their Absorption and Metabolism. *Flavonoids and related compounds: bioavailability and function*. Taylor & Francis Group, LLC. 2012. p. 79 – 92.
- PRŮŠOVÁ, B. 2016. Ústav vinohradnictví a vinařství, ÚVV ZF, Valtická 337, 69144 Lednice, 2016-3-1.
- PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXO, F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000. p. 3396 – 3402.
- RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. 2006. *Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments*. 2nd Edition. West Sussex, England: John Wiley and Sons, Ltd. 2006. 429 s. ISBN 0-470-01037-1.
- SEDLÁČEK, M. *Vliv arbuskulárních mykorhizních hub na fyziologické projevy a plodnost u révy vinné (Vitis vinifera L.)*. Lednice, 2015. Disertační práce. Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta.
- SOMERS, T. C.; EVANS, M. E. 1977. Spectral evaluation of young red wines: anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, “chemical age”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1977. p. 279 – 287.
- SOTOLÁŘ, R. 2006. *Multimediální atlas podnožových, moštových a stolních odrůd révy*. (http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/556/ustav_556/atlas_reva/atlas_reva.pdf).
- SZAROWSKÁ, E. *Hodnocení antioxidační aktivity vybraných aromatických rostlin*. Zlín, 2012. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
- VACHOVÁ, S. *Flavonoidy a antioxidační aktivita červených vín*. Lednice, 2014. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. 1994. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Scientific Publ.: Oxford, 1994. s. 83 – 91.

ZLOCH, Z. 2003. Krátká historie bioflavonoidů. *Vitamins.cz* [online]. 2003. [cit. 1.11.2016]. Dostupné z: (www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/1/L_08AC.doc).

ZOECKLEIN, B. W.; FUGELSANG, K. C.; GUMP, B. H.; NURY, F. S. 1990. *Production Wine Analysis*. Van Nostrand Reinhold Publ.: New York, 1990. s. 129 – 168.