

Mendelova univerzita v Brně
Zahradnická fakulta v Lednici



**Použití nasycených vyšších mastných
kyselin v technologii a skladování vína**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Mojmír Baroň, Ph.D.

Vypracovala:

Bc. Magdaléna Tomková

Lednice 2017



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Bc. Magdaléna Tomková**

Studijní program: Zahradnické inženýrství

Obor: Řízení zahradnických technologií

Název tématu: **Použití nasycených vyšších mastných kyselin v technologii a skladování vína**

Rozsah práce: Min. 45

Zásady pro vypracování:

1. Prostudovat dostupnou literaturu k danému tématu.
2. Výběr vhodného počtu experimentálních vzorků. Rozbory vybraných vzorků kvasících moštů při různém dávkování mastných kyselin a oxidu siřičitého. Analytické vyhodnocení.
3. Vyhodnocení naměřených dat vhodnou statistickou metodou. Diskuse získaných výsledků. Vyvození závěrů a návrh případného návazného výzkumu.



Seznam odborné literatury:

1. MALÍK, M. *Komplementární metody k použití oxidu siřičitého*. Diplomová práce. Brno: MENDELU Brno, 2014. 64 s.
2. BAROŇ, M. Možnost rapidního zvýšení účinnosti oxidu siřičitého pomocí C8 a C10 mastných kyselin. *Vinařský obzor*. 2009. sv. 11, č. 1, s. 509–510. ISSN 1212-7884.
3. BAROŇ, M. *Možnosti snížení obsahu oxidu siřičitého v technologii révařských vín*. 1. vyd. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2013. 50 s. Folia Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis, ISSN 1803-2109 ; roč. VI, 2013, č. 8. ISBN 978-80-7375-924-7.
4. MICHLOVSKÝ, M. *Oxid siřičitý v enologii*. 1. vyd. Rakvice: Vinselekt Michlovský, 2012. 151 s. ISBN 978-80-905319-0-1.
5. KRASŇANSKÝ, L. *Vliv vyšších mastných kyselin na inhibičiu mliečnych baktérií*. Diplomová práce. Lednice: MENDELU Brno, 2013. 57 s.
6. 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>.

Datum zadání diplomové práce: prosinec 2015

Termín odevzdání diplomové práce: květen 2017

L. S.

Bc. Magdaléna Tomková
Autorka práce

doc. Ing. Mojmír Baroň, 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 tuto práci:

„Použití nasycených vyšších mastných kyselin v technologii a skladování vína“

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: 8. května 2017

.....

podpis

Děkuji doc. Ing. Mojmiru Baroňovi za vedení mé diplomové práce, trpělivost, rady, a hlavně za to, že mi byl po celou dobu studia obrovskou inspirací.

OBSAH

1	Úvod.....	12
2	Cíl práce.....	13
3	Literární část	14
3.1	Oxid siřičitý.....	14
3.1.1	Charakteristika látky	14
3.1.2	Oxid siřičitý ve víně.....	14
3.1.3	Limity oxidu siřičitého ve víně	20
3.1.4	Možnosti snížení SO ₂	21
3.1.5	Výhody a nevýhody oxidu siřičitého ve víně	24
3.2	Rizika spojená s oxidem siřičitým	25
3.2.1	Vznik chorob a vad.....	25
3.2.2	Nezastavená fermentace a refermentace.....	26
3.2.3	Odolnost kvasinek	27
3.3	Důvody zájmu o alternativy k SO ₂	28
3.3.1	Oxid siřičitý a jeho vliv na lidské zdraví	28
3.3.2	Technologické hledisko	29
3.3.3	Z pohledu ekonomie	30
3.3.4	Snahy o alternativy k oxidu siřičitému.....	30
3.4	Nasycené vyšší mastné kyseliny	31
3.4.1	Obecná charakteristika.....	31
3.4.2	Význam nasycených vyšších mastných kyselin ve víně	33
3.4.3	Princip fungování.....	34
3.4.4	Zdravotní nezávadnost	36
3.4.5	Použití v praxi	36
3.4.6	Toxicita mastných kyselin ve víně a vznik rezistence	37
3.4.7	Rezidua nasycených vyšších mastných kyselin ve víně	38
3.4.8	Vliv na sensorické (organoleptické) vlastnosti vína	39

4	Praktická část.....	40
4.1	Design experimentu	40
4.2	Materiál	40
4.2.1	Mošt.....	40
4.2.2	Oxid siřičitý	40
4.2.3	Směs vyšších mastných kyselin	41
4.3	Metodika	41
4.3.1	Varianty a kombinace VMK a SO ₂	42
4.3.2	Časová osa průběhu experimentu.....	43
4.3.3	Legenda k údajům v grafech	43
4.4	Metody	44
4.4.1	Metoda dle Rebeleina.....	44
4.4.2	ALPHA analýza	45
4.4.3	Jodometrická titrace	45
4.5	Výsledky.....	46
5	Diskuze	57
6	Vize do budoucna	60
7	Závěr.....	61
8	Souhrn	62
9	Summary.....	63
10	Reference.....	64

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Nárůst aktivního oxidu siřičitého (Rib'erau-Gayon., et al., 2006)	18
Tabulka 2: Maximální povolené množství SO ₂ ve víně (Sedlo, 2009).....	21
Tabulka 3: Chemické metody pro snižování SO ₂ ve víně (Baroň, 2013; Santos, et al., 2012)	23
Tabulka 4: Fyzikální metody pro snižování SO ₂ ve víně (Santos, et al., 2012)	24
Tabulka 5: Výhody a nevýhody oxidu siřičitého ve víně – shrnutí (Guerrero. & Cantos-Villar, 2015)	24
Tabulka 6: Choroby vína při nedostatku SO ₂ (Michlovský, 2012)	25
Tabulka 7: Vady vína při nedostatku SO ₂ (Michlovský, 2012).....	26
Tabulka 8: Citlivost hodnotitelů na přídavek směsi VMK ve víně (Baroň, 2013)	39
Tabulka 9: Základní analytické parametry moštu při startu experimentu (18. 11. 2015).....	41
Tabulka 10: Varianty a kombinace VMK a SO ₂	42
Tabulka 11: Legenda k údajům v grafech	43
Tabulka 12: Změna obsahu zbytkového cukru v závislosti na termínu	46
Tabulka 13: Kontrolní měření oxidu siřičitého	47

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Vývoj zbytkového cukru v závislosti na termínu a množství VMK	48
Graf 2: Účinnost SO ₂ v závislosti na množství VMK	49
Graf 3: Vývoj obsahu zbytkového cukru při dávce 20 mg.l ⁻¹ SO ₂	50
Graf 4: Vývoj obsahu zbytkového cukru při dávce 30 mg.l ⁻¹ SO ₂	50
Graf 5: Vývoj obsahu zbytkového cukru u variant bez přídatku SO ₂	51
Graf 6: Vývoj obsahu zbytkového cukru při dávce 60 mg.l ⁻¹ SO ₂	51
Graf 7: Vývoj obsahu zbytkového cukru v závislosti na SO ₂ a termínu	52
Graf 8: Účinnost oxidu siřičitého	53
Graf 9: Účinnost vyšších mastných kyselin	54
Graf 10: Vývoj obsahu zbytkového cukru v závislosti na množství VMK, SO ₂ a čas	55

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Prostorový model molekuly oxidu siřičitého (Mills, 2007).....	14
Obrázek 2: Chemická struktura kyseliny kaprylové (Calvero, 2007)	32
Obrázek 3: Chemická struktura kyseliny kaprinové (Calvero, 2007)	32
Obrázek 4: Chemická struktura kyseliny laurové (Wikipedia, 2006).....	32
Obrázek 5: Napadení buňky VMK.....	35
Obrázek 6: Deformace buňky po aplikaci VMK.....	36
Obrázek 7: Schéma variant.....	42
Obrázek 8: Časová osa průběhu experimentu	43

SEZNAM ZKRATEK

MO – mikroorganismus/mikroorganismy

MLF – malolaktická fermentace

VMK, HFA – vyšší mastné kyseliny

MCFA – mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem (z angličtiny – Middle Chain Fatty Acids)

ADI – akceptovatelný denní příjem (z angličtiny – Acceptable Daily Intake)

SCF – Vědecký výbor pro potraviny

1 ÚVOD

V posledních letech zaznamenaly velký rozmach snahy o zdravější životní styl. Více přemýšlíme o tom, jak žijeme, jak se stravujeme, co pijeme. Na to samozřejmě musel zareagovat i potravinářský průmysl. Mnoho produktů se vyrábí ve „zdravější“ verzi. Stejně tak je tomu i ve vinařství. Hlavním tématem posledních let je v tomto odvětví snižování oxidu siřičitého, a to z důvodu možné zdravotní závadnosti této látky. Úplné vyloučení SO₂ bez jakékoliv náhrady však není ve většině případů možné.

Zdravotní hledisko je zřejmě nejzávažnější, ale spolu s technologickými nevýhodami nás tato skutečnost nutí k zamyšlení se nad alternativami. Bezesporu byla náhradám oxidu siřičitého věnována velká pozornost, zatím však nebyla nalezena chemická nebo fyzikální metoda, která by byla efektivním prostředkem k ochraně vína při minimalizaci nebo úplném vyloučení SO₂, aniž by měla negativní vliv na lidské zdraví a pokud ano, je značně finančně nebo technicky náročná, a tudíž pro spoustu vinařů nedostupná.

Průlom v této problematice značí probádání vyšších nasycených mastných kyselin, které perfektně fungují jako alternativa k SO₂ a mohou zastoupit roli oxidu siřičitého v antimikrobiálním působení. Je již známo, že mastné kyseliny s delším řetězcem působí jako aktivátory alkoholové fermentace (Rodriguez-Nogales, et al., 2013). Mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem (C₈, C₁₀ a C₁₂) však působí opačně – zastavují alkoholové kvašení a dobrou funkčnost projevují také při inhibici nežádoucí malolaktické fermentace (Guilloux-Benatier, et al., 1998; Viegas & Sá-Correia, 1997). Také jsou schopny zabránit refermentaci u vín s obsahem zbytkového cukru, mohly by se tak stát dobrým pomocníkem při skladování vína (Baroň, 2013).

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je prozkoumat poměrně nové téma, které se objevilo ve vinařském světě. Výzkum navázal na již dříve vzniklou myšlenku použití nasycených vyšších mastných kyselin v technologii a skladování vína. Hypotéza byla potvrzena a nyní nastal pravý čas pro další testování, mapování a celkový souhrn. Literární část je zaměřena na popis dílčích subjektů a dějů, které jsou důležité pro objasnění principu účinku vyšších mastných kyselin. Nemalá pozornost bude věnována také oxidu siřičitému, jelikož je nezbytné porozumět jeho funkci ve víně, abychom pochopili, proč je hledání alternativ k této látce velkým tématem moderního vinařského světa.

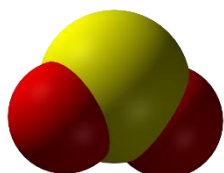
Experimentální část se zabývá potvrzením účinku vyšších mastných kyselin v různých variantách a v kombinaci s oxidem siřičitým nebo bez, a to hlavně při zastavení fermentace s cílem výroby vína zatříděného do kategorie polosuché, popřípadě polosladké. Výsledky experimentu jsou analyticky a statisticky vyhodnoceny.

Vyústěním této práce by měl být ucelený teoretický přehled o dané problematice podpořený praktickým testem s průkaznými výsledky, jenž nám nastíní nejvýhodnější variantu vyšších mastných kyselin a oxidu siřičitého. Cílem je potvrdit použití VMK jako bezpečné alternativy k oxidu siřičitému.

3 LITERÁRNÍ ČÁST

3.1 OXID SIŘIČITÝ

3.1.1 CHARAKTERISTIKA LÁTKY



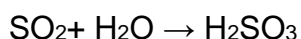
Obrázek 1: Prostorový model molekuly oxidu siřičitého (Mills, 2007)

Síra je elementární prvek nacházející se v periodické tabulce prvků. V případě oxidace síry vzniká oxid siřičitý, pro který je charakteristická ostrá štiplavá vůně. Oxidace je chemický termín označující ztrátu elektronů daného prvku (Henderson, 2009).

Oxid siřičitý vzniká spalováním síry ($S + O_2 \rightarrow SO_2$) (Michlovský, 2012).

Oxidací se z oxidu siřičitého stává oxid sírový (SO_3).

SO_2 je bezbarvý plyn, ve vodě se rozpouští a mění na kyselinu siřičitou:



(Malík, 2014)

Kyselina siřičitá se ve víně váže na aldehydy a cukry. Postupnou oxidací kyseliny siřičité vzniká ve víně kyselina sírová (Smrčka, 2013).

3.1.2 OXID SIŘIČITÝ VE VÍNĚ

Oxid siřičitý je díky svým všestranným vlastnostem zdánlivě nepostradatelnou pomůckou při výrobě vína. Zajisté je možné obejít se bez přídavku SO_2 , takový postup má však mnoho úskalí a je třeba dbát zvýšené opatrnosti. Víno bez přídavku SO_2 lze vyrobit, ale musíme vzít v potaz, že samotné kvasinky jisté

množství oxidu siřičitého vyprodukují již během alkoholové fermentace. Běžně se jedná o koncentraci okolo 10 mg.l⁻¹, ale může být i větší než 30 mg.l⁻¹. Úplná absence oxidu siřičitého ve víně je tedy velmi vzácná (Rib'erau-Gayon., et al., 2006).

V současnosti je považováno použití oxidu siřičitého jako antimikrobiálního činidla a antioxidantu jako nezbytný zásah při snaze zachovat kvalitu vína a jeho čerstvost. Nicméně, při nesprávném použití může být vliv oxidu siřičitého negativní (Henderson, 2009).

Obsah oxidu siřičitého je nejčastěji měřen jodometrickou titrací, která je na provedení sice jednoduchá, ale nedává nám přesnou koncentraci SO₂, neboť stanovuje spolu s SO₂ také obsah dalších reduktonů. To může vést k nesprávnému zasíření vín (Fic, 2015).

Oxid siřičitý se vyznačuje několika schopnostmi, ve víně se vyskytuje v několika formách, přičemž nejaktivnější je ve formě H₂SO₃. Následující rovnice představuje tři podoby oxidu siřičitého vyskytujícího se ve víně:



Vysvětlení:

- molekulární SO₂ v roztoku s vodou (H₂O)
- hydrogensířičitan, HSO₃⁻ ion
- sulfit, SO₃²⁻ ion (Carel, 2011)

Působení oxidu siřičitého

Biologický účinek

Zabraňuje aktivitě apikulátních kvasinek a nežádoucích bakterií (mléčných a octových).

Antioxidační účinek

Dokáže vyvázat rozpuštěný kyslík, čímž chrání látky obsažené ve víně před oxidací. Samotný oxid siřičitý je jen velmi málo oxidovatelný přímo kyslíkem, reaguje s plynným nebo rozpuštěným kyslíkem a oxiduje se na sírany, které dávají vínu kovovost a tvrdost. U červených vín je důležitá spolupráce SO₂ a polyfenolů, které účinnost oxidu siřičitého podporují.

Deaktivace enzymů

Deaktivuje enzymy přenášející kyslík, potlačuje degradaci barviv a aromatických látek. Působí hlavně na oxidázy, například tyrosinázu, kterou ničí spolehlivě (oxidáza hroznů). Má také destruktivní vliv na lakázu, ovšem inaktivace tohoto enzymu probíhá obtížněji, a to kvůli vyšší potřebě SO₂ a také reziduální oxidativní aktivitě lakázy, takže stále zůstává riziko pozdější oxidace (typické pro mladá vína z nahnilých hroznů – nejprve příjemné aroma i chuť, později rychlé stárnutí, degradace barvy a kvality) (Baroň, 2013; Michlovský, 2012).

Oxid siřičitý zabraňuje zhnědnutí vína pomocí inaktivace enzymů PPO (polyfenoloxidáza), POD (peroxidáza) a proteáza a také inhibicí Maillardovy reakce (Santos, et al., 2012).

Působení na organoleptické vlastnosti

Díky vyvázání kvasných produktů (hlavně acetaldehydu, kyseliny pyrohroznové a látek obsahujících ketonovou nebo karbonylovou skupinu) zlepšuje aroma vína. Odstraňuje pach zvětralosti a má vliv i na barvu. Oxid siřičitý barvu vína chrání, jelikož zabraňuje oxidaci různých látek, které jsou odpovědné za hnědé zbarvení vína. Změny v barvě související s SO₂ mají různou rychlost a jsou reverzibilní. SO₂ reaguje na barvu nepřímo, a to pomocí blokace oxidace nebo zabránění destrukce polyfenolů.

Antiseptický účinek

Antiseptická funkce oxidu siřičitého je zodpovědná za inhibici rozvoje mikroorganismů, zabránění vzniku refermentace, snížení rizika bakteriálního

onemocnění vína. Ve formě H_2SO_3 , tedy jako aktivní oxid siřičitý proniká do buněk velmi rychle a narušuje jejich rozvoj, růst (v některých případech zamezí růstu, ale neovlivní životaschopnost bakterie, která se může za příznivějších podmínek znovu vzchopit), rozmnožování a způsobuje smrt buňky. Na bakterie působí SO_2 silněji než na kvasinky. Zároveň se mohou tvořit vazby SO_2 a dalších sloučenin (např. acetaldehyd), kdy přechází volný SO_2 do formy vázané a stává se tak neaktivním. Při malé dávce je účinnost SO_2 přechodná (Baroň, 2013; Michlovský, 2012).

Oxid siřičitý není používán je pro zastavení alkoholové fermentace, ale má také výrazný vliv na inhibici bakterií způsobujících malolaktickou fermentaci, dokonce větší než na alkoholové kvašení způsobené kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*. Nejběžnější bakterií vyvolávající malolaktickou fermentaci je *Oenococcus oeni*, jenž se vyznačuje vysokou citlivostí na SO_2 (Henderson, 2009).

Oxid siřičitý, a tedy i hydrogensířičitan (H_2SO_3), mají v moderním vinařství nezastupitelnou roli, jelikož mošt a víno chrání před nepříznivým oxidačním jevem a velmi pomáhají k mikrobiologické stabilitě vína. Při pokusech o náhradu oxidu siřičitého však nebyly prokázány valné výsledky. Při vyloučení přídatku SO_2 nebylo vyrobeno bezchybné víno. V technologii výroby vína je tedy používání oxidu siřičitého jen těžko zastupitelné, a to i přes nepříznivé vlivy této látky na lidské zdraví (Barril, et al., 2012).

Formy oxidu siřičitého ve víně

Analyticky dělíme SO_2 ve víně na volný a vázaný oxid siřičitý – součet těchto dvou parametrů označujeme za veškerý (celkový) oxid siřičitý, jehož množství je z hlediska zdravotní (ne)závadnosti rozhodující. Množství veškerého oxidu siřičitého je dáno zákonem (Jackowetz & Orduna, 2012; Jackowetz & Orduna, 2013).

Aktivní SO₂

Dříve se téměř veškerá účinnost připisovala volnému oxidu siřičitému. Nyní ale víme, že za jeho antimikrobiální působení je zodpovědná molekulární forma oxidu siřičitého, tedy tzv. aktivní SO₂. Význam aktivní formy oxidu siřičitého spočívá tedy hlavně v jeho vlivu na mikroorganismy (Baroň, 2013; Rib'erau-Gayon., et al., 2006). Efektivita působení aktivní formy oxidu siřičitého je výrazně ovlivněna hodnotou pH – při stoupajícím pH koncentrace molekulárního SO₂ klesá. Jakmile je oxid siřičitý uvnitř buňky, stává se vzhledem k intracelulárnímu pH neaktivnější formou HSO₃ (Divol, et al., 2012).

Tabulka 1: Nárůst aktivního oxidu siřičitého (Rib'erau-Gayon., et al., 2006)

PARAMETR	ZMĚNA PARAMETRU	NÁRŮST AKTIVNÍHO SO ₂
Obsah alkoholu	+ 1 % obj. alk.	5 %
Teplota	+ 1 °C	7 %
pH	-0,2	50 %

Volný SO₂

Tato forma je zastoupena ionem kyselého siřičitanu HSO₃⁻. Antiseptický účinek volného oxidu siřičitého je proměnný v závislosti na pH, tedy ve vztahu k aktivní formě. Zvýšení aktivity volného SO₂ s nárůstem množství alkoholu není významné. Co však stojí za povšimnutí, je narůstající aktivita volného SO₂ současně se stoupající teplotou (při zvýšení teploty z 20 °C na 40 °C je aktivita až čtyřikrát vyšší). Zároveň je volný SO₂ aktivnější, jestliže pH klesá (prostředí je kyselejší). Nepříjemnost sensorického projevu volného oxidu siřičitého je výraznější, je-li víno kyselejší. Stejná koncentrace volného SO₂ může být sensoricky přijatelná u vína kvalitního, ale už ne u méně kvalitních vzorků. Volný oxid siřičitý je důležitý hlavně díky své antioxidační schopnosti. Dokáže vázat acetaldehyd a neutralizovat jeho oxidativní zápach. Kromě acetaldehydu vytváří vazby i s barevnými látkami, takže ovlivňuje barvu vína – červená vína zaznamenávají pokles barvy a u bílých vín brání žloutnutí.

Jelikož již známe i aktivní (molekulární) formu oxidu siřičitého, musíme ji posuzovat odděleně od volného oxidu siřičitého. Rozdíly ve fungování jsou patrné převážně v jejich odlišné závislosti na hodnotě pH. Při nižším pH totiž molekulární SO₂ dokáže bezproblémově inhibovat bakterie a kvasinky, ale volný SO₂ je v nízké koncentraci, aby zabránil oxidaci vína. Proto se dávkování oxidu siřičitého stanovuje dle aktuálního obsahu volného SO₂. Zároveň však platí, že se koncentrace volného SO₂ upravuje podle požadované ochrany před oxidací a aktivní SO₂ dle stavu mikrobiální stability. Je nutné brát v potaz i sensorický projev, který může být negativně ovlivněn. Práh citlivosti má aktivní SO₂ při 1 mg.l⁻¹ (štipání v nose). Není však možné regulovat volný a aktivní SO₂ odděleně. Platí, že při zvýšení obsahu volného SO₂ se zvyšuje i hodnota molekulárního SO₂ (Baroň, 2013; Barril, et al., 2012; Fic, 2015; Grant-Preece, et al., 2013).

Vázaný SO₂

Vázaný oxid siřičitý definujeme jako součet všech siřičitanů vázaných na sloučeniny vína, přičemž jednotlivé sloučeniny nejsou sensoricky rozpoznatelné. Důležitým parametrem, který posuzujeme, je množství vázaného (a také veškerého) SO₂, jenž je v přijatelné míře a nezpůsobuje zdravotní komplikace. Tato hodnota je označována zkratkou ADI a je tvořena celkovým oxidem siřičitým, z něhož je větší část vázána (Corte, et al., 2012; Ishiwata, et al., 2003).

Vázaný oxid siřičitý je technologicky nevýznamný, ale tvoří „paměť vína“, protože koncentrace oxidu siřičitého je přímo úměrná technologickým postupům ve vinařství.

Nejdůležitější vazbou oxidu siřičitého je vazba s karbonylovými sloučeninami (s jednou nebo více aldehydovou nebo ketonovou funkcí). Nejreaktivnější je molekulární SO₂. V mošttech vyrobených ze zdravých hroznů je téměř všechno volný SO₂ vázán kyselinou pyrohroznovou, kyselinou oxoglutarovou a glukózou.

V bílých vínech je volný SO₂ vázán převážně acetaldehydem, pak také kyselinou pyrohroznovou a oxoglutarovou. U červených vín dochází k vazbě s antokyany a fenolovými sloučeninami. V případě, že je surovina (hrozny) napadena hnilobou,

bývá volný oxid siřičitý vázán i jinými sloučeninami a dochází k úplnému vyvázání volného SO₂ (Baroň, 2013).

Endogenní SO

Endogenní SO₂ se vyskytuje ve vínech, do kterých nebyl přidán oxid siřičitý uměle, tedy technologickým zásahem. Endogenní oxid siřičitý vzniká enzymatickou činností kvasinek. Tato forma SO₂ je ve víně v koncentraci od 0 až po 40 mg·l⁻¹ a je ovlivněna čistotou fermentačního prostředí (více čiré – více produkce endogenního SO₂), obsahem metioninu a cysteinu, kmenem kvasinek (vysoká tvorba endogenního SO₂ u kmenů kvasinek citlivých na SO₂, nižší produkce u uměle vyselektovaných kmenů) (Bizaj, et al., 2012; Rib'erau-Gayon., et al., 2006).

Výsledky Pezleyho studie (2015) ukazují, že množství endogenního volného oxidu siřičitého vyprodukovaného kvasinkami během alkoholové fermentace je nedostatečné pro ochranu vína před nežádoucí oxidací v průběhu kvašení a zrání.

3.1.3 LIMITY OXIDU SIŘIČITÉHO VE VÍNĚ

Množství oxidu siřičitého ve víně je určeno nařízením (ES) 606/2009 s účinností od 10. 7. 2009. Hodnota veškerého oxidu siřičitého je v rámci Evropské unie hlídána a kontrolována příslušnými orgány (Tabulka 2). Limity pro volný SO₂ nejsou stanoveny.

Tabulka 2: Maximální povolené množství SO₂ ve víně (Sedlo, 2009)

Typ vína		Maximální povolené množství SO ₂ [mg.l ⁻¹]
Tiché víno	Bílé	200
	Červené	150
Tiché víno s obsahem zbytkového cukru min. 5 g.l ⁻¹	Bílé	250
	Červené	200
Přívlastkové víno	Pozdní sběr	300
	Výběr z hroznů	350
	Výběr z bobulí, výběr z cibéb	400
	Ledové, slámové	400
Šumivé víno	Všechny kategorie	185
	Ostatní šumivá vína	235
Likerové víno	S obsahem zbytkového cukru max. 5 g.l ⁻¹	150
	S obsahem zbytkového cukru min. 5 g.l ⁻¹	200

3.1.4 MOŽNOSTI SNÍŽENÍ SO₂

Technologické postupy

Jak již bylo řečeno, koncentrace oxidu siřičitého (zejména ve formě vázané) je důkazem přístupu k výrobě vína. Proto by mělo být víno vyráběno s rozvahou a se snahou maximalizovat dobré vlastnosti suroviny, a to bez nadbytečných enologických zásahů.

Základním předpokladem pro správné hospodaření s oxidem siřičitým je průběžná analýza suroviny – hroznů, moštu a později vína. Díky získaným parametrům je možné lépe určit vhodnější načasování a dávku SO₂ (Michlovský, 2012). Určení příhodného momentu síření a přiměřené dávky oxidu siřičitého zajišťuje správné fungování této látky, tedy i největší účinnost při minimálním přídatku. Při takovém rozhodování je velmi důležité zohlednit fázi, ve které se víno momentálně nachází (např. fermentace), záměrně probíhající nebo potlačované jablečno-mléčné kvašení, předpokládaná spotřeba vína (archivace, okamžitá spotřeba). Je ověřeno, že šetrné zacházení s vínem v každé fázi výroby

pomáhá celkové kvalitě výsledného vína a tudíž vede k menší potřebě síření (Henderson, 2009).

Sur lie

Další metodou, jak snížit potřebu oxidu siřičitého, je *sur lie*. Tento způsob výroby vína je založen na ležení mladého vína na kvasničných kalech (Lesko, et al., 2011). Využívá se tak redukční síly kvasinek, čímž je potřeba SO₂ snížena. Při takovém způsobu výroby vína vznikají mannoproteiny, sloučeniny, jež vážou antokyany a pomáhají tak k zajištění stability barvy. Tato metoda s sebou však nese jistá rizika – například vznik nežádoucího sirovodíku (nedostatečné množství vazebných sloučenin, přeměna SO₂ na elementární síru atd.). Jestliže je prostředí až příliš reduktivní, stává se vhodným pro vznik tzv. sirky a výskyt kvasinek *Brettanomyces spp.* (Baroň, 2013; Rib'erau-Gayon., et al., 2006).

Malolaktická fermentace

Hlavní účinek malolaktické neboli jablečno-mléčné fermentace je odkyselení vína a změna jeho charakteru a aroma. Kromě těchto funkcí působí také na bakteriální stabilitu vína, a to velmi příznivě. Princip zvyšování bakteriální stability pomocí MLF je založen na potlačení růstu jiných bakterií, než-li těch, které jsou za malolaktickou fermentaci zodpovědné. Děje se tak kvůli spotřebě živin v médiu (víně). Další mikroorganismy se tedy potýkají s nevlídnými podmínkami pro existenci. Mohou vznikat také bakteriociny, jež jsou toxické pro některé mikroby. Již proběhlá MLF v jisté fázi výroby vína se zabrání vypuknutí nežádoucí MLF v lahvi. Správně proběhlá a kontrolovaná malolaktická fermentace vede díky zvýšení bakteriální stability vína k menší potřebě oxidu siřičitého (Baroň, 2013).

Chemické metody pro snižování SO₂

Tabulka 3: Chemické metody pro snižování SO₂ ve víně (Baroň, 2013; Santos, et al., 2012)

CHEMICKÁ METODA	PŘIDANÁ LÁTKA	EFEKT/POTENCIÁLNÍ EFEKT	NEVÝHODY
	DMDC	Inhibice růstu MO	Méně účinné proti bakteriím ve srovnání s kvasinkami
	Bakteriociny	Inhibice růstu bakterií, kontrola MLF	Nemají vliv na růst kvasnic
	Fenolické sloučeniny	Inhibice růstu mikroorganismů, antioxidační aktivita, nemá vliv na spotřebu dusíkatých sloučenin, může poskytnout lepší smyslové vjemy	Možné negativní změny v barvě a aroma vína
	Kyselina askorbová	Antioxidační aktivita	Vliv na chuť, krátké působení, vedlejší produkt – H ₂ O ₂
	Koloidní stříbro	Kontrola vývoje mléčných a octových bakterií, mění metabolismus kvasinek, které pak produkují menší množství etanolu	Obsahové změny, nezastavuje <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ,
	Vanilin	Inhibice enzymů, které se účastní výroby buněčné energie; narušuje také funkčnost buněčných membrán	Citlivost je rozdílná u různých druhů, některé mikroorganismy ho mění na alkohol a deriváty kyselin (<i>Brettanomyces spp.</i>), nutná vysoká koncentrace – vliv na aroma
	Kyselina sorbová	Konzervace, s SO ₂ narušuje pH homeostázy kvasinek a plísní, zastavení kvašení	Žádný antioxidační účinek, riziko rozkladu na 2-ethoxy-3,5-hexandien – vznik vady "vůně po pelargoniích"
	Lysozom	Inhibice růstu bakterií, kontrola MLF	Nízká aktivita proti G- bakteriím, neaktivní ke kvasinkám, váže se s polyfenolickými složkami červeného vína, riziko tvorby zákalu vína

Fyzikální metody pro snižování SO₂ ve víně

Tabulka 4: Fyzikální metody pro snižování SO₂ ve víně (Santos, et al., 2012)

FYZIKÁLNÍ METODA	APLIKOVANÝ JEV	EFEKT/POTENCIÁLNÍ EFEKT	NEVÝHODY
	Pulsující elektrická pole (PEF)	Eliminace patogenních MO, zkrácení doby macerace, zvýšení extrakce fenolických látek, urychlení zrání vína	
	Ultrazvuk	Zvyšuje extrakci fenolických sloučenin, urychluje zrání vína	
	Ultrafialové záření	Eliminace patogenních MO, obohacuje víno o stilben	Ve srovnání s bílým vínem je v červeném víně méně účinnější
	Vysoký tlak	Eliminace patogenních mikroorganismů	V závislosti na situaci může aktivovat některé enzymy, což může vést ke snížení obsahu antokyanů a činnosti antioxidantů

3.1.5 VÝHODY A NEVÝHODY OXIDU SIŘIČITÉHO VE VÍNĚ

Tabulka 5: Výhody a nevýhody oxidu siřičitého ve víně – shrnutí (Guerrero. & Cantos-Villar, 2015)

VLASTNOST	VÝHODA	NEVÝHODA
Antioxidační účinek	Inaktivace enzymů způsobujících hnědnutí, inhibice Maillardovy reakce, zachycení kyslíku, reakce s peroxidem vodíku, redukce chinonů	Efektivita závisí na hodnotě pH
Antimikrobiální účinek	Zabránění vzniku kvasinkového zákalu, zabránění refermentace, prevence proti vzniku ethylfenolů, biogenních aminů a různých příchutí	Efektivita závisí na hodnotě pH, koncentrace 30-50 mg.l ⁻¹ je neúčinná proti některým MO
Senzorický projev	Komplexnější chuť	Při vyšší koncentraci nepříjemné chutě a vůně, riziko vzniku merkaptanů a sirovodíku
Zdraví		Alergické reakce – dermatitida, kopřivka, angioedém, bolesti břicha, průjem, zúžení průdušek, anafylaxe

3.2 RIZIKA SPOJENÁ S OXIDEM SIŘIČITÝM

Bez přidání oxidu siřičitého je víno vystaveno nebezpečí negativního ovlivnění kvality vína. Je zřejmé, že načasování a množství přídatku oxidu siřičitého musí být podřízeno stylu a složení vína, do kterého se SO₂ přidává. Je sice možné vyrobit víno bez přídatku oxidu siřičitého, přesto se však bude ve víně vyskytovat alespoň v minimální koncentraci (vznik během fermentace) (Henderson, 2009).

Někdy se ošetření pomocí SO₂ jeví jako jediná varianta při zásahu proti vadě či chorobě vína a přídatku se tedy nelze vyhnout. Ovšem i příliš vysoká koncentrace oxidu siřičitého nese riziko vzniku vady vína, proto je snahou udržet obsah SO₂ v minimální koncentraci.

3.2.1 VZNIK CHOROB A VAD

Neošetřené víno je náchylné k mnoha chorobám a vadám:

Tabulka 6: Choroby vína při nedostatku SO₂ (Michlovský, 2012)

CHOROBA	PŘÍČINA	PROJEV	PREVENCE	OŠETŘENÍ
Křís	Křísové kvasinky prodávají alkohol na kyselinu octovou a CO ₂	Bílý povlak na hladině vína	Doplňování nádob, skladování vína pod inertním plynem	Doplnění nádoby – vyplavení bílého povlaku, síření
Octovatění	Octové bakterie, přístup vzduchu, vznik těkavých kyselin (často již ve vinici), alkohol = substrát pro vytváření octu	Typické octové aroma	Zdravé hrozny, čisté a hygienické prostředí výroby	
Myšina	Bakterie (<i>L. brevis</i> , <i>L. cellobiosus</i>) Kvasinky (<i>Brettanomyces</i>)	Pach – myší moč	Síření rmutu nebo moštu, vyčištění a síření mladého vína	Přídavek SO ₂ aktivní uhlí, čerstvé vinné kvasnice
Animální tóny	Kvasinky <i>Brettanomyces</i> (k rozmnožování potřebují cukr)	Animální tóny, pach koňského potu/sedla	Sklepní hygiena, konzervace prázdných dřevěných sudů pomocí SO ₂	Stočení a filtrace vína, zvýšení volného SO ₂ na min. 40 mg.l ⁻¹
Kvasinkové a bakteriální zákaly	Množení MO, nízký obsah alkoholu, zbytkový cukr	Zákal	Sterilní filtrace, dezinfekce veškerého zařízení, přirozený vývoj školení vína	Sterilní filtrace, síření

Tabulka 7: Vady vína při nedostatku SO₂ (Michlovský, 2012)

VADA	PŘÍČINA	PROJEV	PREVENCE	OŠETŘENÍ
Oxidáza	Přístup vzduchu, nízký obsah SO ₂	Změna barvy – nahnědlé tóny, typická změna aroma (shnilé jablko)	Kontrola obsahu SO ₂ , doplňování nádob s vínem, skladování vína pod inertním plynem	Silné síření, stabilizace obsahu volného SO ₂
Hnědnutí vína	Přístup vzduchu – oxidace – hnědnutí (míra závisí na obsahu polyfenolů)	Změna barvy – hnědnutí	Viz prevence oxidázy	
Pachuť po kyselině sírové	Příliš intenzivní konzervace dřevěných sudů pomocí SO ₂	Oxidace SO ₂ na H ₂ SO ₄	Vymytí/naplnění dřevěného sudu vodou před naplněním vínem	Aktivní uhlí, odkyselení

3.2.2 NEZASTAVENÁ FERMENTACE A REFERMENTACE

Alkoholová fermentace je hlavním procesem utvářejícím víno (Hui, et al., 2007). Je tedy zřejmé, že je věnováno mnoho úsilí k prozkoumání tohoto jevu. Ne vždy ale vinaři mohou nebo chtějí ponechat kvašení volný průběh a nechat kvasinky svou práci zcela dokončit. Proto se čím dál častěji objevují snahy o nalezení vhodných prostředků k zastavení fermentace a ponechání zbytkového cukru ve víně. Problematika alkoholové fermentace a ovlivňujících faktorů je příliš složitá, tato práce je zaměřena především na fázi zastavení kvašení.

V některých případech se jeví podmínky pro alkoholovou fermentaci jako naprosto ideální – vyšší obsah kyselin, nižší pH, dostatek dusíkatých látek v moštu. Takové prostředí zabezpečuje bezproblémové kvašení, ale zároveň způsobuje mikrobiální nestabilitu, jelikož kvasinky jednoduše zesílí a stanou se tak i více odolnými vůči nepříznivým vlivům, tedy i k oxidu siřičitému. Pokud je v moštu dostatek (nebo i přebytek) dusíkatých látek, které kvasinkám slouží jako zdroj živin, mají kvasinky více síly k rozmnožování a nabytí imunity. Jejich cílem je fermentaci dokončit a vytrvat až do stavu zcela suchého vína – bez zkrasitelných cukrů. Proces si můžeme představit jako zadaný pracovní úkol, pro který mají kvasinky – pracovníci – dokonalé podmínky, dostatečný pohon a nedokončený projekt – kvasící mošt. Dokud budou mít energii, neskončí s prací,

a to ani v případě, že narazí na pokus o jejich inhibici, například oxidem siřičitým. V takovém případě se může jako řešení jevit sterilní filtrace, ovšem následný stav vína (sterilní) nelze možné zcela ubránit opětovné infekci a následně refermentaci neboli opětovnému rozkvašení. Takové jevy jsou ve víně nežádoucí, obzvláště v případech, kdy chceme ponechat jisté množství zbytkového cukru a víno zařadit do kategorie polosuché (popřípadě polosladké, sladké). V posledních letech byl vyvinut přípravek obsahující vyšší mastné kyseliny, který by mohl vyřešit problematiku refermentace a zastavení alkoholového kvašení (Baroň, 2013). Tato látka je hlavním tématem celé diplomové práce a bude jí věnována pozornost níže.

3.2.3 ODOLNOST KVASINEK

Nejvíce testů bylo provedeno s kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*. Je již dávno známé, že SO₂ má vliv na růst kvasinkových buněk, sporulaci a zotavení. Schopnost kvasinek odolávat oxidu siřičitému se liší dle fáze, ve které se právě nacházejí. Buňky jsou odolnější v exponenciální fázi, kdežto v pozdější stacionární fázi je jejich odolnost značně nižší. Kvasinky dokáží tolerovat oxid siřičitý jen po velmi krátkou dobu, dokud nedojde k jejich trvalému poškození. Při vyšších teplotách se zintenzivňuje antimikrobiální aktivita oxidu siřičitého. Je nutno podotknout, že i vína ošetřená pomocí SO₂ (a speciálně při zastavení kvašení) mohou obsahovat i při následném zrání v sudech větší obsah kvasinek, které mohou způsobit nežádoucí refermentaci.

Rezistence kvasinek k oxidu siřičitému má tzv. polygenní charakter (malý vliv na fenotyp, kvantitativní znak). Tento znak je dědičný, a to i v případě nepřítomnosti SO₂ v daném prostředí. Odolnost vůči oxidu siřičitému je často doprovázena rezistencí na ostatní fungicidy (např. kyselina sorbová, kyselina benzoová). Bylo provedeno několik různých testů odolnosti kvasinek k SO₂, stále však není tato problematika důkladně prozkoumána. Můžeme však říci, že rezistence kvasinek k SO₂ je velmi variabilní a liší se jak mezi druhy, tak i mezi kmeny. K vysoce tolerantním patří kvasinky *Zygosaccharomyces bailii* a *Schizosaccharomyces pombe*. Kmeny *Saccharomyces cerevisiae* jsou ve srovnání s ostatními k SO₂

poměrně tolerantní, přesto je jejich odolnost velmi různorodá. K citlivým kvasinkám vůči SO₂ řadíme *Kloeckera apiculata* a *Hansenula anomala* (Divol, et al., 2012).

3.3 DŮVODY ZÁJMU O ALTERNATIVY K SO₂

3.3.1 OXID SIŘIČITÝ A JEHO VLIV NA LIDSKÉ ZDRAVÍ

Oxid siřičitý patří do skupiny siřičitanů a v potravinách je označován kódem E220. Siřičitany v potravinách plní několik funkcí (např. inhibice enzymového i neenzymového hnědnutí, antimikrobiální aktivita atd.).

Obsah siřičitanů v potravinách se pohybuje od 10 mg.kg⁻¹ až po 1000 mg.kg⁻¹ – nejvíce jsou obsaženy v sušeném ovoci, ovocných šťávách a vínu.

Vědecký výbor pro potraviny (SCF) určil hodnotu ADI (akceptovatelný denní příjem) na 0-0,7 mg SO₂/kg tělesné hmotnosti člověka. Určit průměrný denní příjem je však velmi problematické.

U obecné populace není znám výskyt přecitlivělosti na siřičitany, ale u lidí trpících astmatem se výskyt nežádoucích reakcí po požití siřičitanů odhaduje na 4-66 % (rozdíl je dán různou formou požití – roztok, inhalace atd.) (Ministerstvo zemědělství, 2012).

Přestože je při výrobě vína oxid siřičitý velmi důležitý, narůstají obavy o zdravotní závadnost této látky, a to hlavně kvůli potvrzeným alergickým projevům způsobených SO₂. Tyto obavy vedou mezinárodní výzkumná střediska k úsilí nalézt náhradní řešení. Taková bádání mají předpoklad dostatečné znalosti vlastností a podmínek použití SO₂. Vzniklo několik studií alternativ k oxidu siřičitému, které by se měly vyvarovat nevýhod SO₂. Otázkou stále zůstává účinnost alternativních látek ve víně (Fredericks, et al., 2011; Guerrero. & Cantos-Villar, 2015).

Přes všechny výhody oxidu siřičitého jsou siřičitany (odvozené sloučeniny od SO₂) spojené v některých případech s alergickými reakcemi spotřebitelů. Většina jedinců, kteří jsou citliví na takové látky, reagují na množství 20-50 mg požitých

siřičitanů. Mohou zažít řadu příznaků, a to včetně dermatitidy, kopřivky, bolestí břicha, průjmu, zúžení průdušek a anafylaxe, přičemž nejčastější projevy u lidí se zvýšenou citlivostí na siřičitany jsou dermální problémy a potíže cest dýchacích. Nežádoucí reakce na siřičitany se projevují převážně u lidí trpících astmatem, u zdravých jedinců jsou takové projevy velmi vzácné. Astmatici, kteří užívají steroidy, nebo mají vyšší senzitivitu dýchacích cest, mohou spadat do případů zvýšeného rizika vzniku alergické reakce na potraviny obsahující siřičitany. U takového typu lidí může být alergická reakce na siřičitany závažná, jelikož deriváty oxidu siřičitého mohou způsobit aktivaci proto-onkogenů, inaktivaci tumor-supresorových genů, a dokonce může hrát roli v patogenezi SO₂ spojené s rakovinou plic (Santos, et al., 2012).

3.3.2 TECHNOLOGICKÉ HLEDISKO

Zatím se oxid siřičitý jeví při výrobě vína jako nezastupitelná sloučenina, a to i přes veškeré negativní vlastnosti. Ve víně může zapříčinit nežádoucí zápach, příliš reduktivní charakter vína a při neopatrném dávkování také překročení zákonem povoleného množství.

Kromě toho je již dnes jasné, že se u kvasinek rozvíjí rezistence k oxidu siřičitému. Tato skutečnost není nijak překvapivá, když si uvědomíme, že každý organismus má pud sebezáchovy, díky němuž může aktivovat obranný mechanismus a pokouší se tak přežít i v nepříznivých podmínkách.

V případě, je-li cílem vyrobit víno se zbytkovým cukrem, je nutné zastavit alkoholovou fermentaci ještě před prokvašením do stavu suchého vína, musíme tedy inhibovat kvasinky a v nejlepším případě zajistit takovou stabilitu vína, aby bylo minimalizováno riziko refermentace. Pokud pomíneme použití oxidu siřičitého, skýtá se nám ještě metoda podchlazení, která je energeticky velmi náročná. Dále se slibně jeví filtrace, jež je pro menší vinařství ve většině případů příliš nákladná a nevhodná. Ovšem kombinací těchto metod (i s použitím SO₂) je možné dosáhnout požadovaného výsledku (Baroň, 2013).

3.3.3 Z POHLEDU EKONOMIE

Dalším nezanedbatelným důvodem, proč je důležité najít alternativu k tak zásadní látce, jako je oxid siřičitý, je také vzestup trendu vín s vyšším zbytkovým cukrem (Mitchell & Hall, 2008). Při výrobě takových vín je potřeba zastavit alkoholovou fermentaci ještě před úplným prokvašením (tedy než je zpracován všechn cukr v moštu), což je často nelehký a velmi nákladný úkol. Nedokonale prokvašená vína nebo vína s vyšším zbytkovým cukrem jsou vhodným médiem pro růst a množení mikroorganismů, které mohou způsobit nevratná organoleptická poškození (Bartowsky, et al., 2002; Nehme, et al., 2008).

Pokud shrneme veškeré faktory ovlivňující výrobu vína s vyšším obsahem zbytkového cukru, naznačí nám to velkou pracnost, s čímž se logicky pojí i vyšší náklady a vyšší prodejní cena výsledného produktu (Bábiková, et al., 2012; Baroň, 2013). Takové metody jsou nedostupné a nereálné pro menší vinařství. Při dalších pokusech o nalezení alternativy k SO₂ by měla být tato skutečnost brána v potaz. Komplementární metody k oxidu siřičitému by měly být vyvíjeny tak, aby finanční zátěž vzniklá s aplikací takového přípravku nebo postupu nebyla až příliš velká, a to ani pro menší a střední podniky.

3.3.4 SNAHY O ALTERNATIVY K OXIDU SIŘIČITÉMU

Názory na výhody a nevýhody oxidu siřičitého se různí, bezpochyby najdeme příznivce i odpůrce, nesmíme však zapomenout původní záměr, a to řešení problému, který je zřejmý – oxid siřičitý je alergen. Proto by měly vést snahy moderního vinařského světa k výrobě „zdravějšího“ vína s co nejméně cizorodými látkami a s obsahem nejlépe takových, které jsou pro lidské tělo přirozené. Vyšší mastné kyseliny se v tomto případě jeví jako naprosto ideální – běžně se vyskytují v mateřském mléce nebo například v ořechu. Zároveň jsou dostatečně antimikrobiálně aktivní, takže dokáží zastavit alkoholovou fermentaci a udržet mikrobiální stabilitu ve víně, a to při redukci dávkování oxidu siřičitého (Baroň, 2013).

3.4 NASYČENÉ VYŠŠÍ MASTNÉ KYSELINY

Jak již bylo řečeno, problematika alkoholové fermentace a jejího zastavení je dosti složitá. Současně s tímto faktem se do obecného povědomí čím dál více dostává skutečnost, že je oxid siřičitý (a siřičitany) alergen, a tudíž látka zdravotně závadná. Tato fakta značně přispívají k motivaci pro hledání alternativních látek. V posledních letech byly výzkumy úspěšné, jelikož bylo zjištěno, že možným doplňkem, který by výrazně obsah SO_2 ve víně snížil, jsou nasycené vyšší mastné kyseliny, respektive kyseliny se středně dlouhým řetězcem (anglická zkratka MCFA).

3.4.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA

Mastné kyseliny jsou karboxylové kyseliny se 4–26 uhlíky. Mají většinou sudý počet uhlíkových atomů (z důvodu syntézy z dvouuhlíkatých jednotek – acetyl-CoA). Existují volné mastné kyseliny nebo jsou součástí lipidů (ve formě esterů s alkoholy – glycerolem, sfingosinem nebo cholesterolem).

Dělí se na nenasycené mastné kyseliny (obsahující jednu a více dvojných vazeb) a nasycené (neobsahující dvojně vazby).

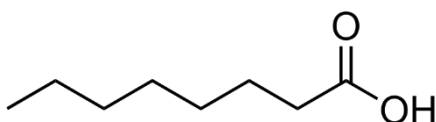
Podle délky uhlíkového řetězce je dělíme na mastné kyseliny s:

- krátkým řetězcem (C_4 – C_6)
- se středně dlouhým řetězcem (C_8 – C_{10})
- dlouhým řetězcem (C_{12} – C_{18})
- velmi dlouhým řetězcem ($> \text{C}_{18}$)

Dle struktury jsou mastné kyseliny dělené na lineární nebo rozvětvené. A podle možnosti syntézy v lidském těle na esenciální a neesenciální mastné kyseliny (Murray, 2002).

Kyselina kaprylová

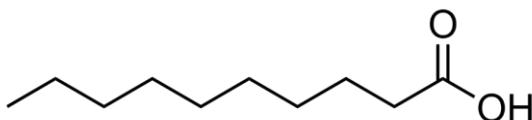
Kyselina kaprylová neboli oktanová ($C_8H_{16}O_2$) má osm atomů uhlíku. Přirozeně se vyskytuje v kokosovém ořechu a mateřském mléce. Jedná se o olejovitou kapalinu málo rozpustnou ve vodě. Využití může mít například při léčbě bakteriálních infekcí, je účinná proti kvasinkám a plísním v organismu. (Nair, et al., 2005).



Obrázek 2: Chemická struktura kyseliny kaprylové (Calvero, 2007)

Kyselina kaprinová

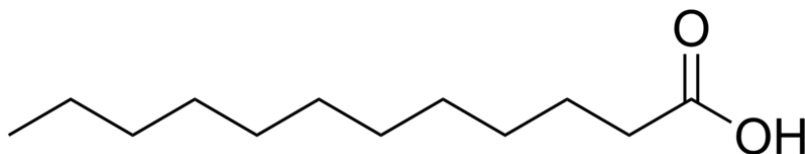
Kyselina kaprinová neboli dekanová ($C_{10}H_{20}O_2$) obsahuje deset atomů uhlíku. Její název je odvozen od latinského slova *capra* (česky „koza“), jelikož se přirozeně vyskytuje v kozím mléce (Anneken, et al., 2002). Kyselinu kaprinovou přirozeně obsahuje mléko a kokosový olej (Nair, et al., 2005).



Obrázek 3: Chemická struktura kyseliny kaprinové (Calvero, 2007)

Kyselina laurová

Kyselina laurová (též laurinová) neboli dodekanová ($C_{12}H_{24}O_2$) je mastná kyselina obsahující dvanáct atomů uhlíku (Murray, 2002). Přirozeně je obsažena v palmojádrovém a kokosovém oleji (Budínová, 2016).



Obrázek 4: Chemická struktura kyseliny laurové (Wikipedia, 2006)

3.4.2 VÝZNAM NASYCENÝCH VYŠŠÍCH MASTNÝCH KYSELIN VE VÍNĚ

Zkoumání VMK pro jejich fungicidní účinky ve víně započalo již před mnoha lety. (Bardi, et al., 1999). U některých byla zjištěna schopnost aktivace či podpory alkoholové fermentace – jedná se o mastné kyseliny C₁₆ a C₁₈ (Rodriguez-Nogales, et al., 2013; Son, et al., 2009), u mastných kyselin s kratším řetězcem (C₈, C₁₀ a C₁₂) byla objevena naopak schopnost inhibice alkoholové a malolaktické fermentace (Guilloux-Benatier, et al., 1998; Garbay, et al., 1995; Sacorreia, 1986; Viegas & Sá-Correia, 1997; Callul, et al., 1991; Cabral, et al., 2001).

Kyseliny C₈, C₁₀ a C₁₂ mají fungicidní vlastnosti a jsou v jistém množství syntetizovány samotnými kvasinkami (jako vedlejší produkt syntézy lipidů (Taylor & Kirsop, 1977)) během alkoholové fermentace (Lafon-Lafourcade, et al., 1984). Množství těchto sloučenin uvolněných do kvasícího média (tedy moštu) je závislé na kmenu kvasinek a dalších podmínkách alkoholové fermentace – například teplotě, pH, přístupu vzduchu (Jones, et al., 1981; Krauss & Forch, 1975; Garbay, et al., 1995). V některých případech mohou způsobit problematický průběh a dokončení alkoholové fermentace nebo předčasné zastavení (Viegas & Sá-Correia, 1997; Viegas & Sá-Correia, 1991; Sajbidor, et al., 1992; Pina, et al., 2004). Inhibičně působí kromě fermentace alkoholové také na jablečno-mléčné kvašení. Jednotlivé mastné kyseliny však nejsou tak účinné jako směs ve správném poměru oktanové, dekanové a dodekanové kyseliny (Baroň, 2013; Divol, et al., 2006).

Nejtoxičtější by se mohla zdát kyselina dekanová (C₁₀), která je však hůře rozpustná než ostatní kyseliny, kvůli tomu je její toxicita v moštu nebo víně snížena. Také větší délka řetězce dekanové kyseliny nenarušuje buňky tak efektivně jako menší molekuly. Kromě toho, větší molekuly mají v menší koncentraci sklon ke tvorbě sraženin (Correia, et al., 1989; Lafon-Lafourcade, et al., 1984; Viegas & Sá-Correia, 1991; Viegas, et al., 1989; Viegas, et al., 1994).

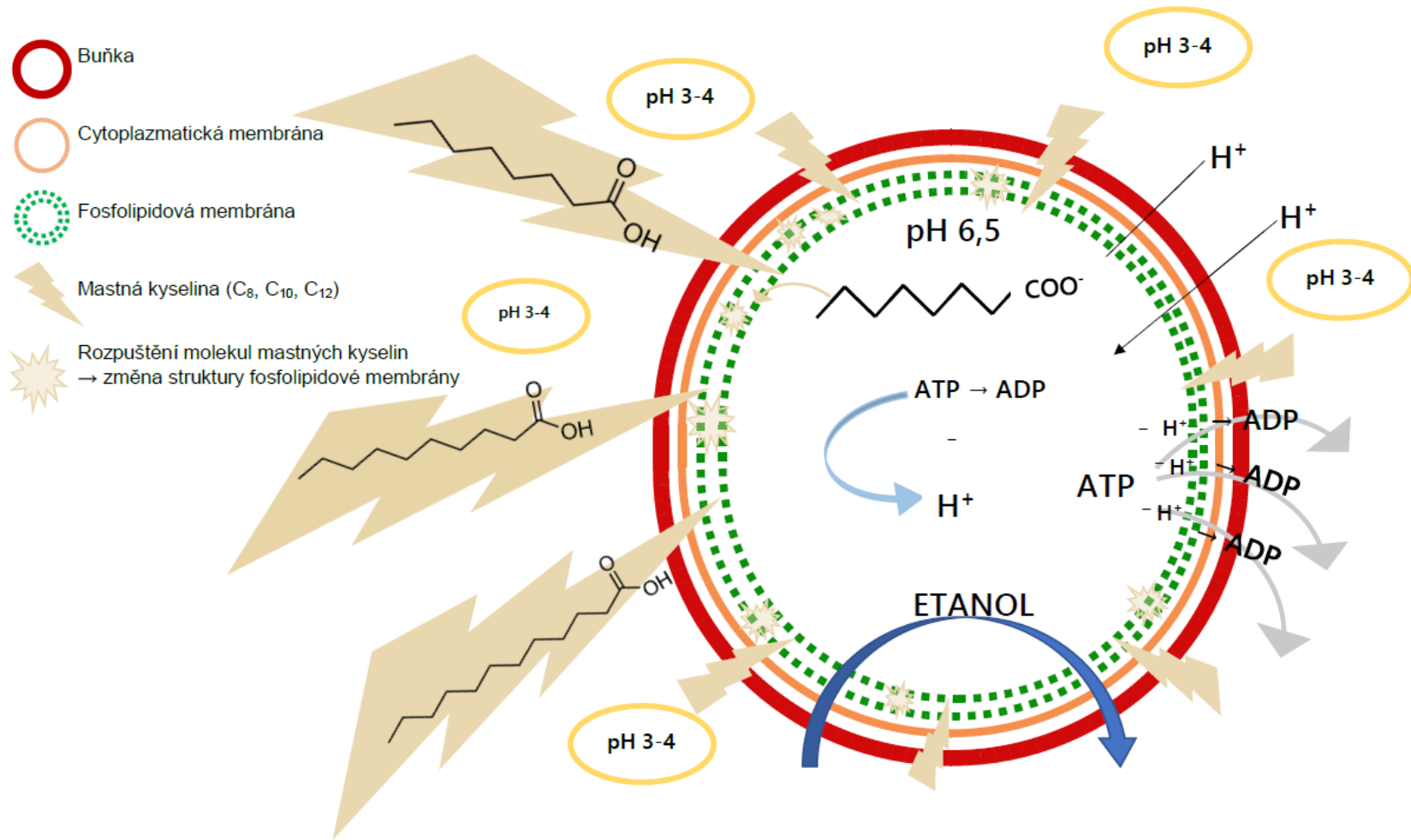
Účinnost mastných kyselin je samozřejmě přímo ovlivněna fází, ve které jsou do moštu či vína aplikovány. V případě, že jsou přidány do kvasícího moštu, je

metabolická aktivita kvasinek velmi rychle potlačena a kvasinky uhynou, tím se alkoholová fermentace zpomalí nebo zcela zastaví. Při aplikaci do hotového vína jsou vyšší mastné kyseliny prevencí proti nežádoucí malolaktické fermentaci nebo také fungují jako obrana před nechtěnou refermentací. Dalším rozdílem mezi působením na alkoholovou a malolaktickou fermentaci jsou konkrétní VMK. Zatímco pro bakterie *Oenococcus oeni* jsou toxické především kyseliny kaprinová a laurová a jejich estery, na kvasinky způsobující alkoholovou fermentaci účinkuje nejvíce kyselina kaprinová, a to i přes její horší rozpustnost (Bábiková, et al., 2012; Garbay, et al., 1995; Guilloux-Benatier, et al., 1998).

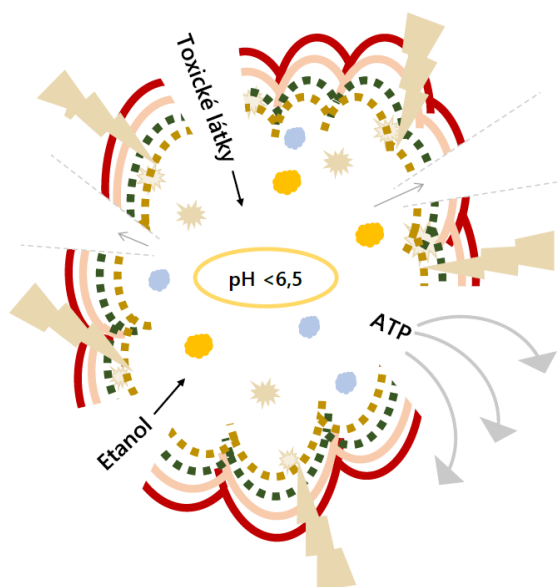
3.4.3 PRINCIP FUNGOVÁNÍ

Mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem pronikají (pasivní difuze (Liu, et al., 2013)) do kvasinek přes plazmatickou membránu a uvnitř jsou jako nedisociované molekuly rozpuštěny ve fosfolipidové vrstvě membrány, přičemž jsou deaktivovány další lipid-lipid a lipid-proteinové interakce a speciálně uspořádaná membrána je změněna. To má pro buňku fatální následek, jelikož membránové lipidy a jejich uspořádání hrají důležitou roli při udržování normální funkce plazmatické membrány (Vanderrest, et al., 1995). Sníží se intracelulární pH, zvýší se permeabilita membrány a změní se transportní systém. Zároveň jsou v buňce akumulovány toxické anionty. Do buňky mohou vnikat různé látky, které kvasince škodí. Poškozená kvasinka ztratí možnost přeměňovat glukózu na etanol a následně uhyne. Zjednodušeně lze říci, že mastná kyselina pronikne do kvasinky, přemění její strukturu, buňka se stane propustnou a nefunkční, což vede k jejímu usmrcení (Viegas, et al., 1985; Cabral, et al., 2001; Legras, et al., 2010; Alexandre, et al., 1996).

Jedním z faktorů, který by mohl mít vliv na mechanismus působení VMK ve víně by mohl být druh kvasinek. Při testování bylo zjištěno, že různé druhy potřebují různé dávky vyšších mastných kyselin (Baroň, 2013).



Obrázek 5: Napadení buňky VMK



Obrázek 6: Deformace buňky po aplikaci VMK

3.4.4 ZDRAVOTNÍ NEZÁVADNOST

Nasyčené vyšší mastné kyseliny (respektive kyseliny se středně dlouhým řetězcem – C₈, C₁₀ a C₁₂) nejsou zdravotně závadné. Již bylo zmíněno, že se přirozeně vyskytují v některých olejích nebo také v ořechách a mateřském mléce. Při snaze snižovat dávku oxidu siřičitého kvůli jeho neblahému vlivu na lidské zdraví se jeví tato vlastnost VMK jako velká výhoda. A to i přesto, použijeme VMK jen jako doplněk k SO₂, a nikoliv jeho úplnou náhradu (Baroň, 2013).

3.4.5 POUŽITÍ V PRAXI

Směs vyšších mastných kyselin může značně snížit potřebu síření. Bylo prokázáno, že dávka 150 mg.l⁻¹ SO₂ a 9 mg.l⁻¹ VMK má stejnou účinnost jako 250 mg.l⁻¹ samotného SO₂ (Rib'erau-Gayon., et al., 2006). Přidávané množství vyšších mastných kyselin by nemělo přesáhnout 10 mg.l⁻¹ a dávkování by mělo probíhat 24 hodin před sířením (Baroň, 2013).

V posledních letech proběhlo několik studií zabývajících se účinkem nasycených vyšších mastných kyselin ve víně. Co se týče alkoholové fermentace, byl prokázán vyšší úhyn při kombinaci vyšších mastných kyselin a oxidu siřičitého, a

to při různém objemu ošetřovaného vína. Aplikace proběhla v době, kdy měl kvasící mošt obsah zbytkového cukru 50 mg.l^{-1} . Již samotné VMK měly významný vliv na množství odumřelých kvasinek, ale v takovém případě je větší riziko refermentace, tato problematika bude popsána níže. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo u aplikace VMK 40 mg.l^{-1} , a to s i bez oxidu siřičitého. Taková dávka je však v běžném provozu příliš vysoká. Pro zastavení kvašení je dostačující dávka 10 mg.l^{-1} v kombinaci s SO_2 . Zároveň došlo k nižší potřebě oxidu siřičitého, protože narušené buňky ho vstřebávají efektivněji. Tak se snížil i obsah vázaného SO_2 . Souhrnně řečeno – vyšší procento usmrcení kvasinek při nižší koncentraci SO_2 (Baroň, 2013). Zastavení alkoholové fermentace pomocí VMK, přičemž by výsledné víno obsahovalo zbytkový cukr, bude věnována experimentální část této práce.

Kromě alkoholové fermentace bylo zkoumáno také související téma refermentace vín se zbytkovým cukrem. I v těchto případech dosahovalo ošetření vín pomocí VMK pozitivních výsledků. Doba, kdy víno nebylo znehodnoceno, se s VMK prodloužila až na dvojnásobek (Baroň, 2013).

U spontánní malolaktické fermentace nebyly výsledky až tak ohromující, ale stále platí, že jsou VMK vhodným doplňkem k SO_2 , protože podpoří jeho funkčnost a tím sníží jeho potřebné množství (Capucho & Sanromao, 1994).

3.4.6 TOXICITA MASTNÝCH KYSELIN VE VÍNĚ A VZNIK REZISTENCE

Toxicita mastných kyseliny (C_8 , C_{10}) se během kvasného procesu zvyšuje, a to pomocí ethanolu a nízkého pH – to podporuje jejich vnikání do buňky, což má za následek snižování pH uvnitř buňky. Během odezvy transkriptomu (souhrn všech RNA vznikající v buňce (Rédei, 2008)) dochází také k aktivaci mechanismů, které se podílejí na vzniku rezistence kvasinek k mastným kyselinám. Současně tedy v buňce fungují protichůdné mechanismy – jeden buňku zpřístupňuje a deformuje, druhý naopak aktivuje obranný systém a zvyšuje rezistenci (Legras, et al., 2010).

Kombinace mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (C_6 , C_8 a C_{10} – množství každé kyseliny 3 mg.l^{-1}) způsobí rapidní potlačení kvasinek.

Koncentrace kvasinek klesla po aplikaci takové směsi z $8 \cdot 10^6$ buněk na mililitr na $4 \cdot 10^4$ buněk na mililitr, a to během čtyř dnů. Degradace cukrů byla zcela zastavena. Problém nastal po několika týdnech, kdy se počet kvasinek opět zvýšil a začala refermentace. Tento jev nastal pravděpodobně kvůli esterifikaci mastných kyselin. Estery mají nižší inhibiční účinek než kyseliny, ze kterých jsou odvozeny. Kvasinky se tak mohly snáze přizpůsobit prostředí (Baroň, 2013; Comitini & Ciani, 2007; Geneix, et al., 1983).

Propustnost membrány vyvolaná převážně kyselinou oktanovou měla dle studie Cabralové (2001) za následek zvýšení obsahu kyseliny olejové (C_{17}) uvnitř buňky. Doplnění kyseliny olejové do prostředí způsobí snížení netěsnosti buňky, takže je permeabilita membrány nižší a kvasinka se opět stává odolnější. Rezistence buněk k vyšším mastným kyselinám se tedy zvyšuje (Liu, et al., 2013). Kyselina oktanová působí na alkoholovou fermentaci sice inhibičně, zároveň však spouští obranný mechanismus buněk, které se vůči ní stávají rychleji odolnější než vůči ostatním mastným kyselinám se středně dlouhým řetězcem. Tento jev zatím není důkladně prostudován (Cabral, et al., 2001; Peddie, 1990; Borrul, et al., 2015).

3.4.7 REZIDUA NASYCENÝCH VYŠŠÍCH MASTNÝCH KYSELIN VE VÍNĚ

Tato část patří bezesporu k výhodám, které nese použití vyšších mastných kyselin ve vinařském průmyslu. Velká část přidaných VMK je absorbována nebo asimilována kvasinkami. Zbytek je pak esterifikován a zůstává ve víně jako reziduum, v tomto případě ale mluvíme o zanedbatelném množství. Vyšší mastné kyseliny se fixují na těla uhynulých kvasinek, která jsou v procesu výroby z vína postupně odstraněna. Nebyl zjištěn významný rozdíl reziduí VMK a esterů u vín ošetřených pomocí VMK a u vín bez aplikace této látky. Zároveň nebyl zaznamenán zvýšený výskyt těkavých látek (Baroň, 2013; Rib'erau-Gayon., et al., 2006; Viegas, et al., 1985).

3.4.8 VLIV NA SENZORICKÉ (ORGANOLEPTICKÉ) VLASTNOSTI VÍNA

Baroň (2013) uvádí, že vliv vyšších mastných kyselin na sensorický projev vína je takřka nulový. Vysvětluje to eliminací směsi vyšších mastných kyselin, jenž se fixují na těla kvasinek. Chuť a vůně samotné směsi mastných kyselin je nejčastěji popisována jako mýdlová, parafínová, připomínající žluklý tuk, mokrou kůži nebo celulózu. Při běžném dávkování (do 30 mg.l⁻¹) jsou mastné kyseliny ve víně jen těžce rozpoznatelné, do dávky 6 mg.l⁻¹ zcela nerozpoznatelné. Dle průzkumu byla jejich přítomnost zaznamenána až od množství 16 mg.l⁻¹ a spolehlivě pak od koncentrace 30 mg.l⁻¹.

Tabulka 8: Citlivost hodnotitelů na přídavek směsi VMK ve víně (Baroň, 2013)

PŘÍDAVEK VMK [mg.l ⁻¹]	CITLIVOST HODNOTITELŮ							ODEZVA [%]
1	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	0
2	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	0
3	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	0
4	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	0
5	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	0
6	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ano	Ano	29
16	Ne	Ne	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	71
30	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	100
80	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	100

4 PRAKTICKÁ ČÁST

Hlavním cílem experimentu bylo sledování a potvrzení účinnosti vyšších mastných kyselin jako inhibitoru alkoholové fermentace s cílem výroby vína s vyšším zbytkovým cukrem a za účelem snížení potřeby oxidu siřičitého. Experiment probíhal v roce 2015.

4.1 DESIGN EXPERIMENTU

Praktická část práce byla prováděna v listopadu 2015 u kvasícího moštu z odrůdy ‚Laurot‘ (rosé). Cílem tohoto experimentu bylo potvrdit nebo vyvrátit účinek vyšších mastných kyselin při zastavení alkoholové fermentace. Měření a kontrola vývoje zastavení kvašení byla porovnávána u dvaceti čtyř různých variant a kombinací vyšších mastných kyselin a oxidu siřičitého. Vývoj alkoholové fermentace a jejího zastavení byl kontrolován po dobu deseti dnů od aplikování VMK a SO₂. Průběh byl monitorován každodenním měřením obsahu zbytkových cukrů, výsledky byly statisticky vyhodnoceny.

4.2 MATERIÁL

4.2.1 MOŠT

Výchozím materiálem byl mošt z odrůdy ‚Laurot‘, jenž byl určen pro výrobu vína rosé. Hrozny, ze kterých byl mošt vyroben, byly posbírány 2. 11. 2015.

Alkoholová fermentace byla zahájena po odkalení, tedy 4. 11. 2015 a probíhala v nerezovém tanku. Čtrnáct dní po odkalení byla část moštu z nerezového tanku odebrána a rozdělena do dvaceti čtyř variant (18. 11. 2015).

4.2.2 OXID SIŘIČITÝ

Oxid siřičitý byl používán ve své pevné formě – jako K₂S₂O₅ („pyrosulfid“), který byl však z praktického hlediska kvantitativně převeden na čistou formu. Dávky oxidu siřičitého pak byly 0, 20, 30, 40, 50 a 60 mg.l⁻¹.

4.2.3 SMĚS VYŠŠÍCH MASTNÝCH KYSELIN

Pro tento experiment byl zvolen stejný poměr jednotlivých VMK pro všechny varianty SO₂, a to C₈ : C₁₀ : C₁₂ = 20 : 70 : 10. 100 mg VMK (v příslušném poměru) bylo rozpuštěno ve vodném roztoku hydroxidu draselného (objem 1 l). Dávky směsi VMK byly pak 0, 5, 10 a 20 mg.l⁻¹.

4.3 METODIKA

Jak již bylo řečeno, pro tento experiment byla vybrána odrůda „Laurot“. Nejdůležitějším a směrodatným parametrem pro tento pokus byl obsah zbytkového cukru, podle jehož hodnoty bylo rozhodnuto o načasování aplikace vyšších mastných kyselin a oxidu siřičitého. Průběžný stav byl kontrolován pomocí ALPHA analyzátoru. U experimentu byl určen start pokusu na datum 18. 11. 2015, kdy obsah zbytkového cukru činil 25,6 g.l⁻¹.

V tomto momentě byly změřeny základní analytické parametry moštu (Tabulka 9) a část moštu byla rozdělena do 24 skleněných lahví o objemu 0,75 l, přičemž jedna lahev znamenala jednu variantu (vzorek).

Poté byla aplikována směs vyšších mastných kyselin v koncentracích 0, 5, 10 a 20 mg.l⁻¹ (každá koncentrace byla zastoupena šestkrát).

24 hodin po aplikaci vyšších mastných kyselin byl do vzorků nadávkován oxid siřičitý, a to v koncentracích 0, 20, 30, 40, 50 a 60 mg.l⁻¹ (viz Tabulka 10 a Obrázek 7).

Varianta bez přídavku vyšších mastných kyselin a oxidu siřičitého sloužila jako kontrolní vzorek.

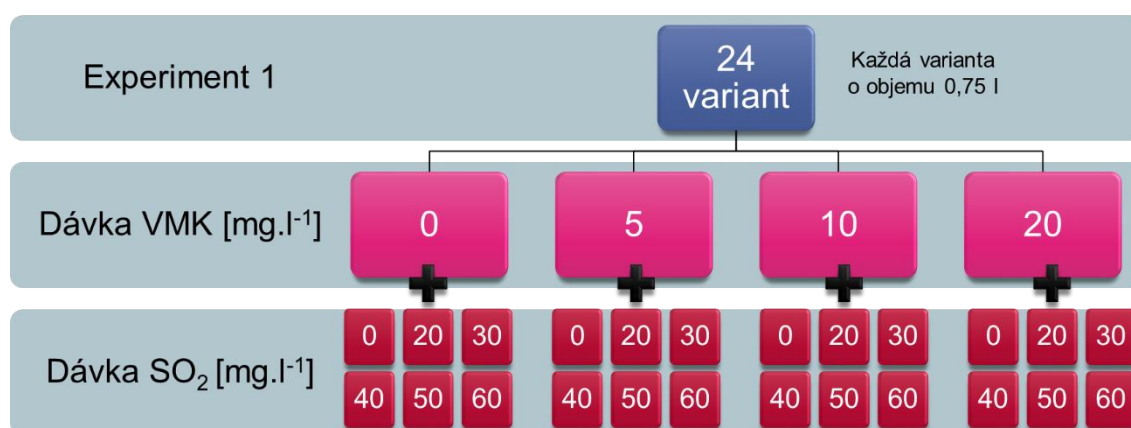
Tabulka 9: Základní analytické parametry moštu při startu experimentu (18. 11. 2015)

PARAMETR	HODNOTA
Titrovatelné kyseliny	9,43 g.l ⁻¹
pH	3,12
Obsah alkoholu	11,15 % obj.
Obsah zbytkových cukrů	25,6 g.l ⁻¹

4.3.1 VARIANTY A KOMBINACE VMK A SO₂

Tabulka 10: Varianty a kombinace VMK a SO₂

VMK/SO ₂ [mg.l ⁻¹]	0	20	30	40	50	60
0	0/0	0/20	0/30	0/40	0/50	0/60
5	5/0	5/20	5/30	5/40	5/50	5/60
10	10/0	10/20	10/30	10/40	10/50	10/60
20	20/0	20/20	20/30	20/40	20/50	20/60



Obrázek 7: Schéma variant

4.3.2 ČASOVÁ OSA PRŮBĚHU EXPERIMENTU

18. 11. 2015	<ul style="list-style-type: none">• Start pokusu• Měření výchozích analytických hodnot• Nadávkování VMK
19. 11. 2015	<ul style="list-style-type: none">• Aplikace SO₂
20. 11. 2015	<ul style="list-style-type: none">• Kontrolní měření volného a vázaného SO₂
19. - 28. 11. 2015	<ul style="list-style-type: none">• Průběžné měření obsahu zbytkového cukru
29. 11. 2015	<ul style="list-style-type: none">• Závěrečné měření obsahu zbytkového cukru
1. 12. 2015	<ul style="list-style-type: none">• Kontrolní měření volného a vázaného SO₂

Obrázek 8: Časová osa průběhu experimentu

Po aplikaci VMK a SO₂ byl kontrolován vývoj obsahu zbytkového cukru, a to metodou dle Rebeleina každých 24 hodin po dobu 10 dnů. Konec měření zbytkového cukru připadl na 29. 11. 2015. Obsah oxidu siřičitého (ve formě volné i vázané) byl změřen v počáteční a závěrečné fázi experimentu, měření bylo pouze orientační.

Výsledky budou statisticky vyhodnoceny níže.

4.3.3 LEGENDA K ÚDAJŮM V GRAFECH

Tabulka 11: Legenda k údajům v grafech

ZKRATKA	VYSVĚTLIVKA	ZKRATKA	VYSVĚTLIVKA
HFA 0	bez přídavku VMK	SO ₂ 0	bez přídavku oxidu siřičitého
HFA 5	aplikováno 5 mg.l ⁻¹ VMK	SO ₂ 20	aplikace 20 mg.l ⁻¹ oxidu siřičitého
HFA 10	aplikováno 10 mg.l ⁻¹ VMK	SO ₂ 30	aplikace 30 mg.l ⁻¹ oxidu siřičitého
HFA 20	aplikováno 20 mg.l ⁻¹ VMK	SO ₂ 40	aplikace 40 mg.l ⁻¹ oxidu siřičitého
Cukry	obsah zbytkového cukru [g.l ⁻¹]	SO ₂ 50	aplikace 50 mg.l ⁻¹ oxidu siřičitého
Termín	měření 20. - 29. 11. 2015	SO ₂ 60	aplikace 60 mg.l ⁻¹ oxidu siřičitého

4.4 METODY

4.4.1 METODA DLE REBELEINA

Množství redukujících cukrů je stanoveno jodometricky na základě rozdílu spotřeb thiosíranu sodného na titraci měďnatého kationtu o definované koncentraci (slepý pokus) a jeho zůstatku po reakci s redukujícími cukry vína bez odstranění interferujících látek.

Postup:

Do 250 ml kuželovité baňky odměřeno 10 ml roztoku 1 a 5 ml roztoku 2, přičemž byl současně připravován slepý pokus (stejný postup, ale namísto vína byla použita destilovaná voda). Obsah baňky byl promíchán krouživým pohybem, poté se ke směsi přidaly 2 ml zkoušeného vína (obsahuje-li víno více než 28 g.l⁻¹ redukujících cukrů, je nutno jej příslušně naředit). Směs byla přivedena k varu a vařena po dobu cca 1 min (do hnědého zbarvení). Pak byla směs neprodleně ochlazená přidávkem 25 ml destilované vody a dochlazená na laboratorní teplotu. Pak bylo přidáno 10 ml roztoku 3, 10 ml roztoku 4 a 10 ml roztoku 5. Neprodleně poté byla směs titrována roztokem 6 do změny barvy z modrofialové na mléčně bílou, která se nemění po dobu 2–3 minut.

- Roztok 1: 41,92 g CuSO₄, 5H₂O a 10 ml 0,5 mol.l⁻¹ H₂SO₄ v 1000 ml destilované vody
- Roztok 2: 250 g vinanu sodno-draselného a 80 g NaOH v 1000 ml destilované vody (rozpuštíme odděleně)
- Roztok 3: 300 g KI a 100 ml 1M NaOH v 1000 ml destilované vody
- Roztok 4: 16% kyselina sírová
- Roztok 5: 0,5% škrobový maz
- Roztok 6: 13,7772 g Na₂S₂O₃, 5H₂O + 50 ml 1 mol.l⁻¹ NaOH v 1000 ml destilované vody

Rozdíl mezi spotřebami titračního činidla u slepého pokusu a konkrétního vzorku udává množství redukujících cukrů v jednotkách g.l⁻¹. (Balík, 1998)

4.4.2 ALPHA ANALÝZA

Přístroj ALPHA je kompaktní FTIR analyzátor využívající vzorkovací techniku ATR, která významně zjednodušuje úpravu vzorku před analýzou. Tento Analyzátor slouží k rychlému určení mnoha kvalitativních parametrů vína, které automaticky vypočítá daný software. Mezi parametry, které přístroj měří, patří: alkohol, hustota, pH, fruktóza, glukóza, zbytkový cukr, veškeré titrovatelné kyseliny, pH a další (Malík, 2014). Pro tento experiment byla tato metoda využívána pro změření základních parametrů moštu a při průběžném kontrolním měření obsahu zbytkového cukru ve víně.

4.4.3 JODOMETRICKÁ TITRACE

Tato metoda je založena na principu redukce roztoku jódu na jodid v neutrálním prostředí. Odměrný roztok jódu reaguje s volným oxidem siřičitým ve víně, který následně jód oxiduje. Vázaný oxid siřičitý se ve víně musí nejprve vyvázat z karbonylových sloučenin v alkalickém prostředí.

Postup:

a) volný oxid siřičitý

Do kónické baňky (250 ml) bylo odměřeno 50 ml testovaného vína pomocí pipety tak, že se pipeta stále dotýkala dna baňky. Neprodleně bylo přidáno 10 ml 16% roztoku H_2SO_4 , 5 ml 0,5% škrobového mazu a směs byla ihned titrována roztokem jódu do modrého zabarvení, které musí vydržet 30 sekund. Spotřeba titračního činidla vynásobená aktuálním faktorem roztoku a konstantou 12,8 udává koncentraci volného oxidu siřičitého v jednotkách $mg.l^{-1}$.

b) veškerý oxid siřičitý

Do kónické baňky (250 ml) bylo odměřeno 25 ml roztoku NaOH (1 mol.l^{-1}) a pipetou přidáno 50 ml testovaného vína tak, že pipeta se stále dotýkala dna baňky. Po 15 minutách stání bylo přidáno 15 ml 16% roztoku H_2SO_4 , 5 ml 0,5% škrobového mazu a směs byla ihned titrována roztokem jódu do modrého zabarvení, které vydrží 30 sekund. Spotřeba titračního činidla vynásobená

aktuálním faktorem roztoku a konstantou 12,8 udává koncentraci veškerého oxidu siřičitého v jednotkách mg.l⁻¹ (Balík, 1998).

4.5 VÝSLEDKY

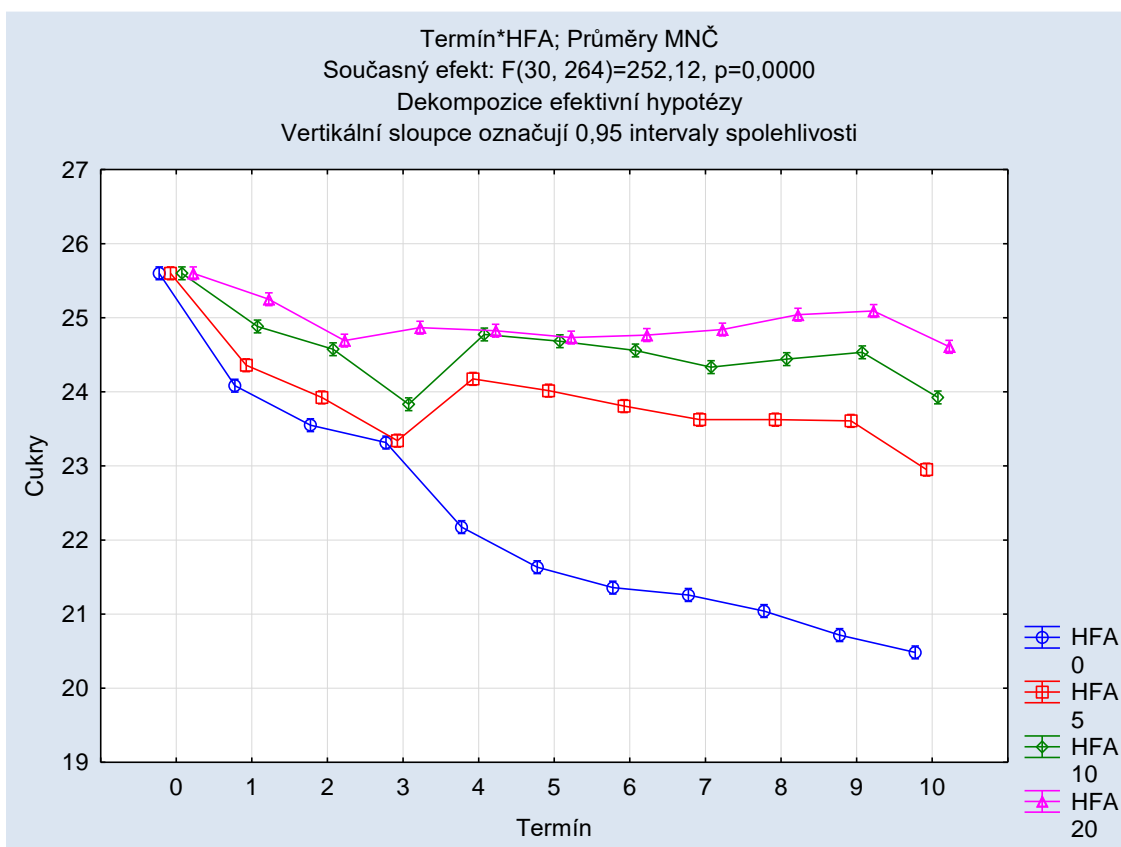
Tabulka 12: Změna obsahu zbytkového cukru v závislosti na termínu

EXPERIMENT 2015		VÝVOJ OBSAHU ZBYTKOVÉHO CUKRU [g.l ⁻¹]						
VMK	SO ₂	20.11	21.11	23.11	24.11	26.11	28.11	29.11
0	0	21,9	20,3	17,1	14,3	14,7	13,1	13,3
0	20	22,3	22,2	19,4	19,3	18,8	17,4	17,3
0	30	24,9	24,4	21,8	21,6	20,1	20,1	19,8
0	40	24,7	24,5	24,4	24,5	24,7	24,7	23,8
0	50	25,5	25,2	25,4	24,9	24,3	24,3	24,3
0	60	25,3	24,8	25,1	25,4	25,1	24,8	24,6
5	0	22,9	21,2	22,1	20,9	20,3	20,3	19,9
5	20	24,4	24,0	23,5	23,5	22,8	22,5	21,1
5	30	24,5	24,2	24,7	24,5	23,8	23,8	22,9
5	40	24,7	24,5	25,2	24,9	25,0	25,0	25,2
5	50	24,8	25,0	25,3	25,3	25,2	25,2	24,4
5	60	24,9	25,0	24,4	25,1	24,7	25,0	24,3
10	0	23,9	23,0	23,3	22,8	22	22,2	21,3
10	20	25,6	25,0	24,8	24,8	23,9	24,1	23,8
10	30	24,9	24,2	24,6	25	24,9	24,9	23,7
10	40	24,9	25,6	25,2	25,1	24,9	25,3	24,8
10	50	24,8	25,2	25,1	25,1	25,3	25,2	25,0
10	60	25,4	24,5	25,8	25,4	25,1	25,6	25,0
20	0	25,0	24,8	23,1	23,1	23,0	23,9	22,8
20	20	25,2	25,0	24,8	25,3	25,1	25,5	24,8
20	30	25,6	25,0	25,3	24,5	25,6	25,6	25,1
20	40	25,7	25,5	25,5	25,5	25,1	25,2	25,2
20	50	25,3	24,0	25,2	25,1	25,2	25,2	25,2
20	60	25,0	24,0	25,1	25,1	25,2	25,2	24,8

Tabulka 12 ukazuje souhrn výsledků měření zbytkového cukru v závislosti na čase. Barevně (žlutá) jsou znázorněny varianty, u kterých byla alkoholová fermentace zastavena téměř okamžitě a došlo jen k nepatrné změně obsahu zbytkového cukru.

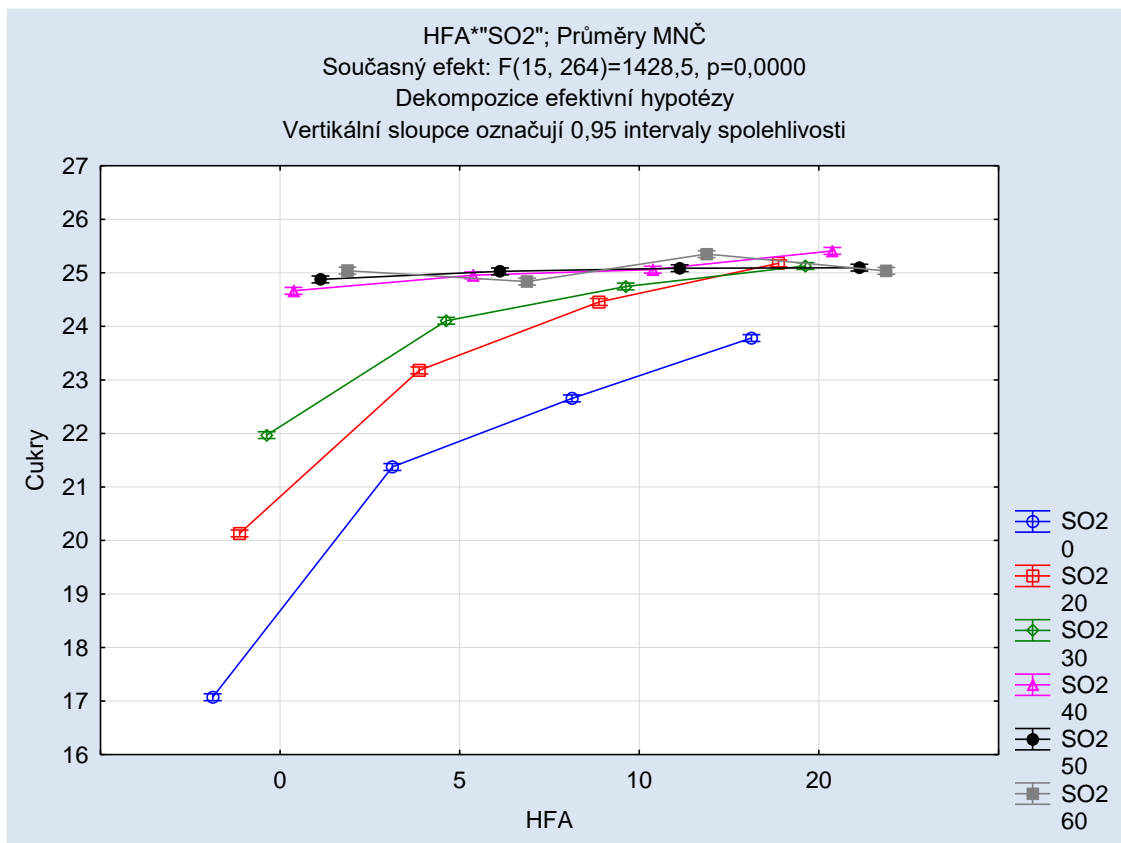
Tabulka 13: Kontrolní měření oxidu siřičitého

VARIANTA [mg.l ⁻¹]		Volný SO ₂ [mg.l ⁻¹]		Veškerý SO ₂ [mg.l ⁻¹]		Vázaný SO ₂ [mg.l ⁻¹]	
VMK	SO ₂	20. 11. 2015	01.12. 2015	20. 11. 2015	01.12. 2015	20. 11. 2015	01.12. 2015
0	0	30	5	49	20	19	15
0	20	28	8	59	34	31	26
0	30	24	7	65	40	41	33
0	40	28	14	78	52	50	38
0	50	39	16	95	64	56	48
0	60	50	17	102	71	52	54
5	0	16	4	62	22	46	18
5	20	24	8	65	36	41	28
5	30	29	8	73	39	44	31
5	40	41	9	84	53	43	44
5	50	50	21	92	62	42	41
5	60	49	26	107	71	58	45
10	0	28	5	49	24	21	19
10	20	25	7	62	35	37	28
10	30	27	10	68	40	41	30
10	40	36	16	88	55	52	39
10	50	45	19	102	70	57	51
10	60	49	24	104	71	91	47
20	0	21	5	59	24	38	19
20	20	29	9	71	44	42	35
20	30	34	15	78	48	43	33
20	40	40	21	92	58	52	37
20	50	49	22	106	64	57	42
20	60	56	25	117	72	61	47



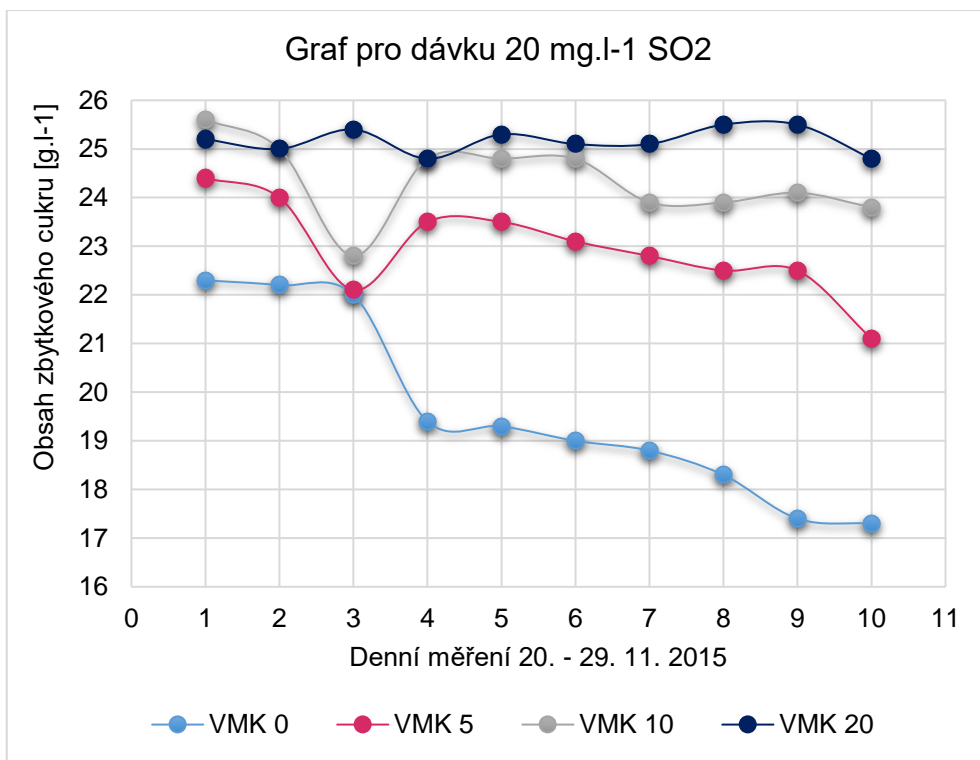
Graf 1: Vývoj zbytkového cukru v závislosti na termínu a množství VMK

Z grafu 1 je zřejmé, že účinek vyšších mastných kyselin při zastavení alkoholové fermentace je prokazatelný. Čím vyšší byl přírůstek vyšších mastných kyselin (HFA), tím byla změna obsahu zbytkového cukru menší.

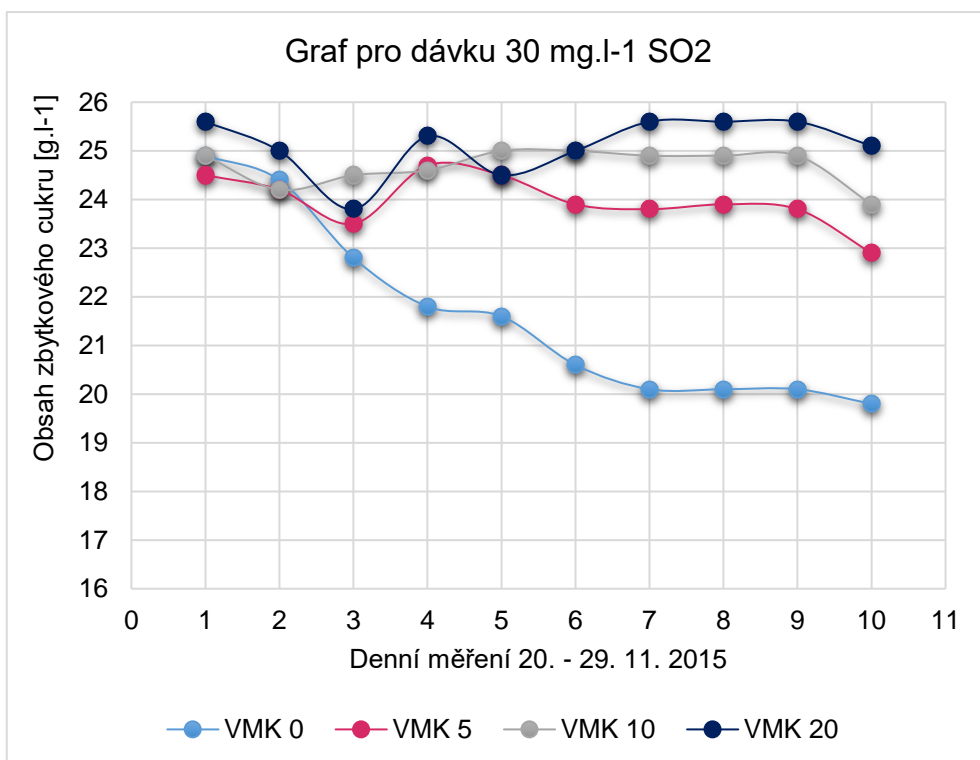


Graf 2: Účinnost SO₂ v závislosti na množství VMK

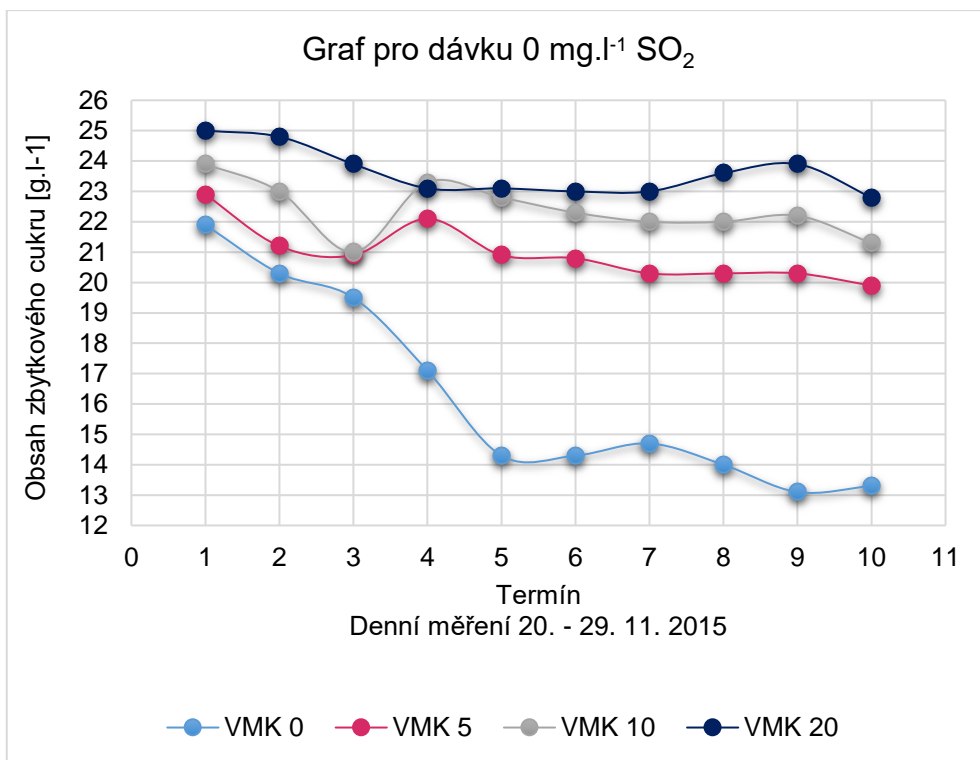
Z grafu 2 lze vyčíst, že dávka od 40 mg.l⁻¹ oxidu siřičitého dokáže alkoholovou fermentaci zastavit nebo alespoň do značné míry zabrzdit, a to i bez VMK, což potvrzuje i graf 3 a 4. Zajímavá je však dávka 20 a 30 mg.l⁻¹ oxidu siřičitého – v kombinaci s vyššími mastnými kyselinami v koncentraci 10 a 20 mg.l⁻¹ se jeví inhibice kvašení velmi slibně. Podrobněji jsou tyto varianty zobrazeny níže (Graf 3 a Graf 4).



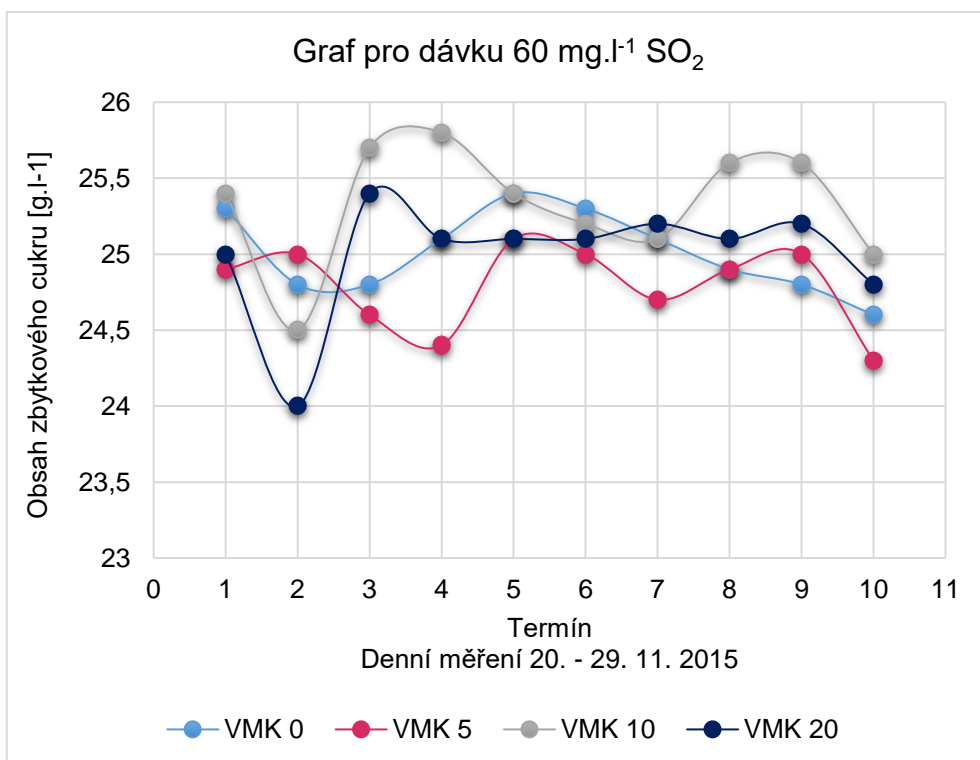
Graf 3: Vývoj obsahu zbytkového cukru při dávce 20 mg.l⁻¹ SO₂



Graf 4: Vývoj obsahu zbytkového cukru při dávce 30 mg.l⁻¹ SO₂

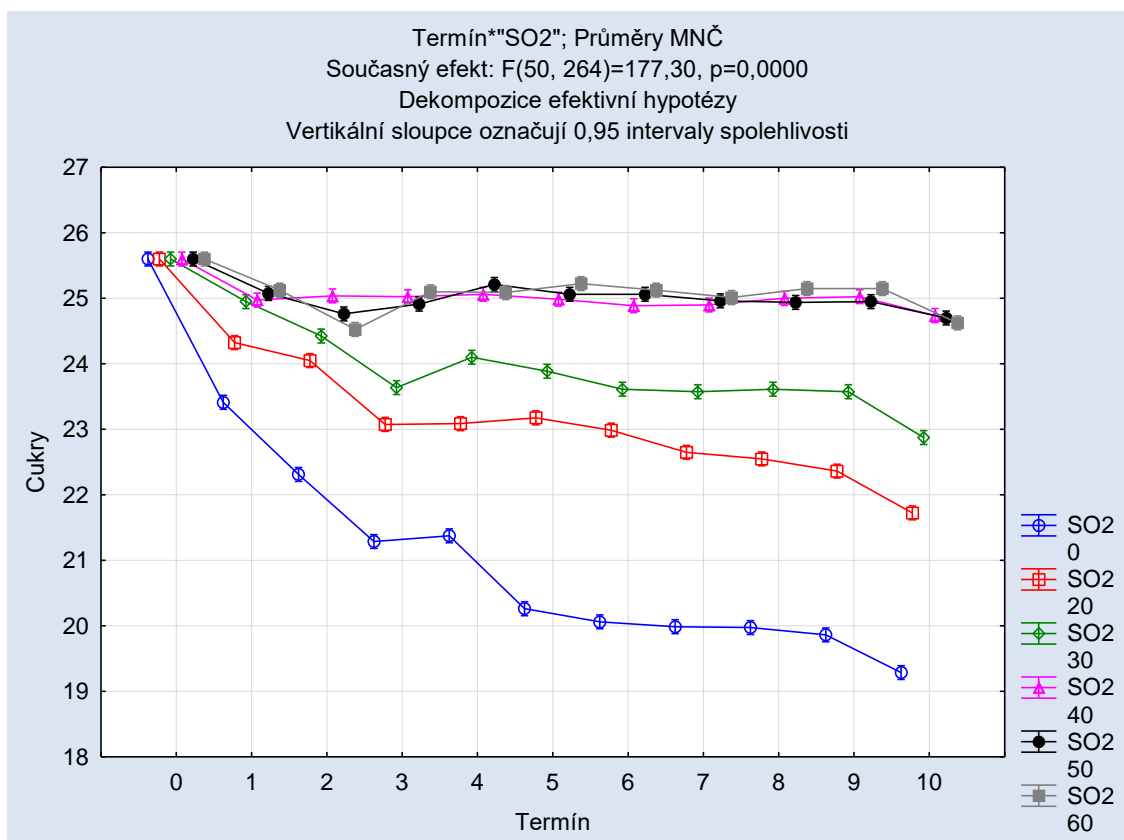


Graf 5: Vývoj obsahu zbytkového cukru u variant bez přídavku SO₂

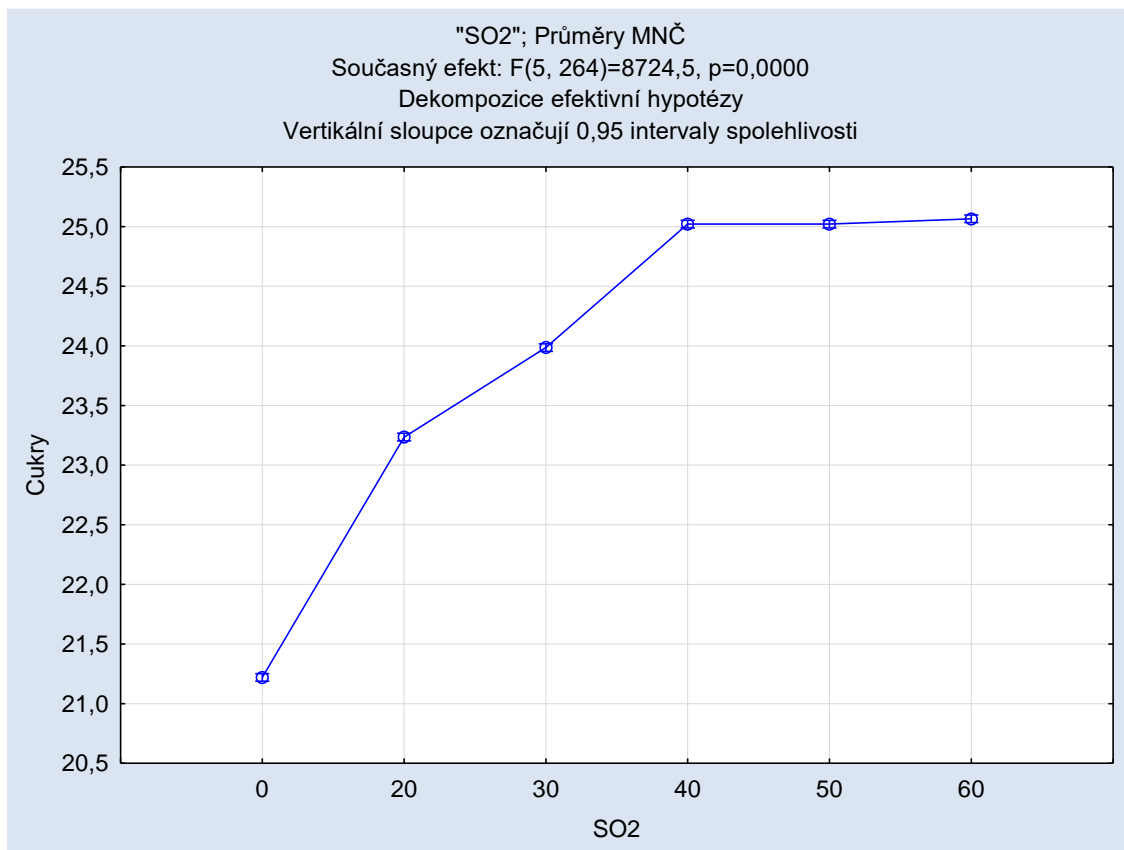


Graf 6: Vývoj obsahu zbytkového cukru při dávce 60 mg.l⁻¹ SO₂

Jestliže se podíváme na Graf 6, je zcela jasné, že i při nízkém nebo nulovém přídavku VMK bylo alkoholové kvašení výrazně zpomaleno až zastaveno. I proto jsou pro tento experiment zajímavější dávky SO_2 kolem 40 mg.l^{-1} . Naproti tomu Graf 5 ukazuje účinnost vyšších mastných kyselin bez přídavku oxidu siřičitého. Jak bylo předpokládáno, se zvyšující se dávkou aplikovaných vyšších mastných kyselin roste účinnost této směsi při zastavení alkoholové fermentace.

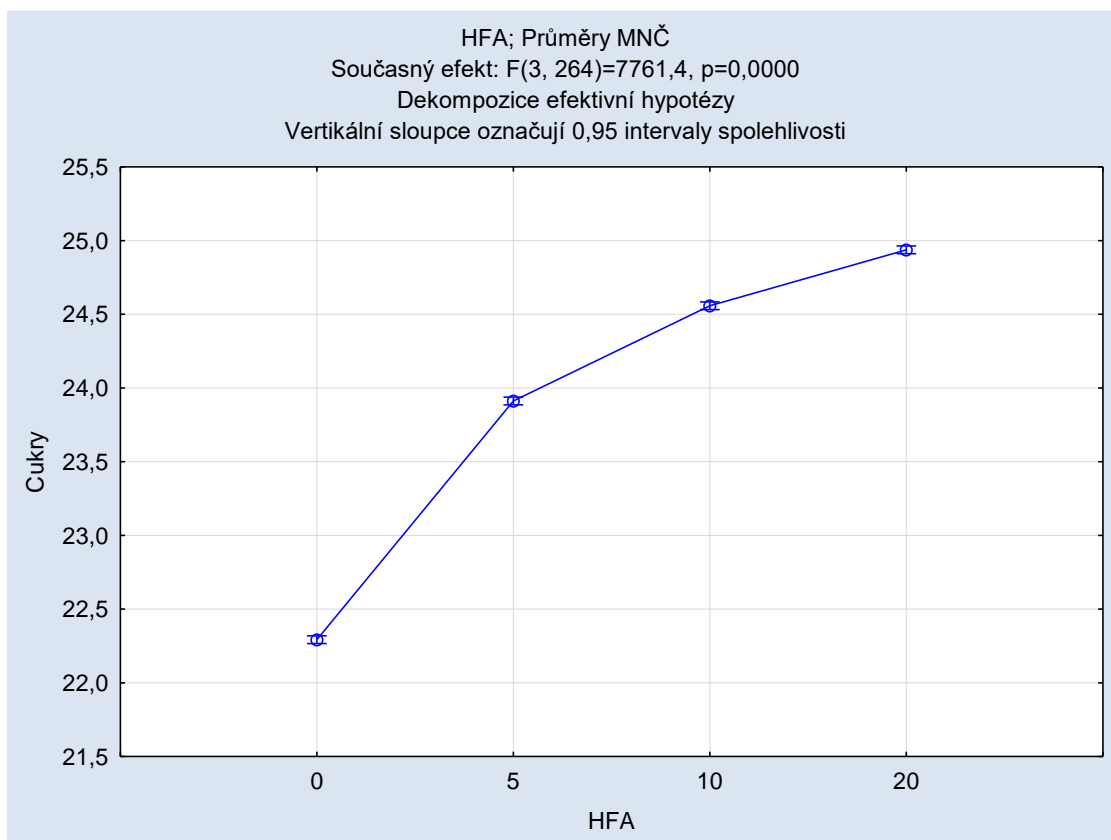


Graf 7: Vývoj obsahu zbytkového cukru v závislosti na SO_2 a termínu



Graf 8: Účinnost oxidu siřičitého

Graf 8 potvrzuje, že se zvyšující se dávkou oxidu siřičitého je alkoholová fermentace zastavena efektivněji. Dávky 40, 50 a 60 mg.l⁻¹ měly téměř shodnou účinnost – změna obsahu zbytkového cukru se u těchto koncentrací lišila jen minimálně (v řádu několika miligramů).

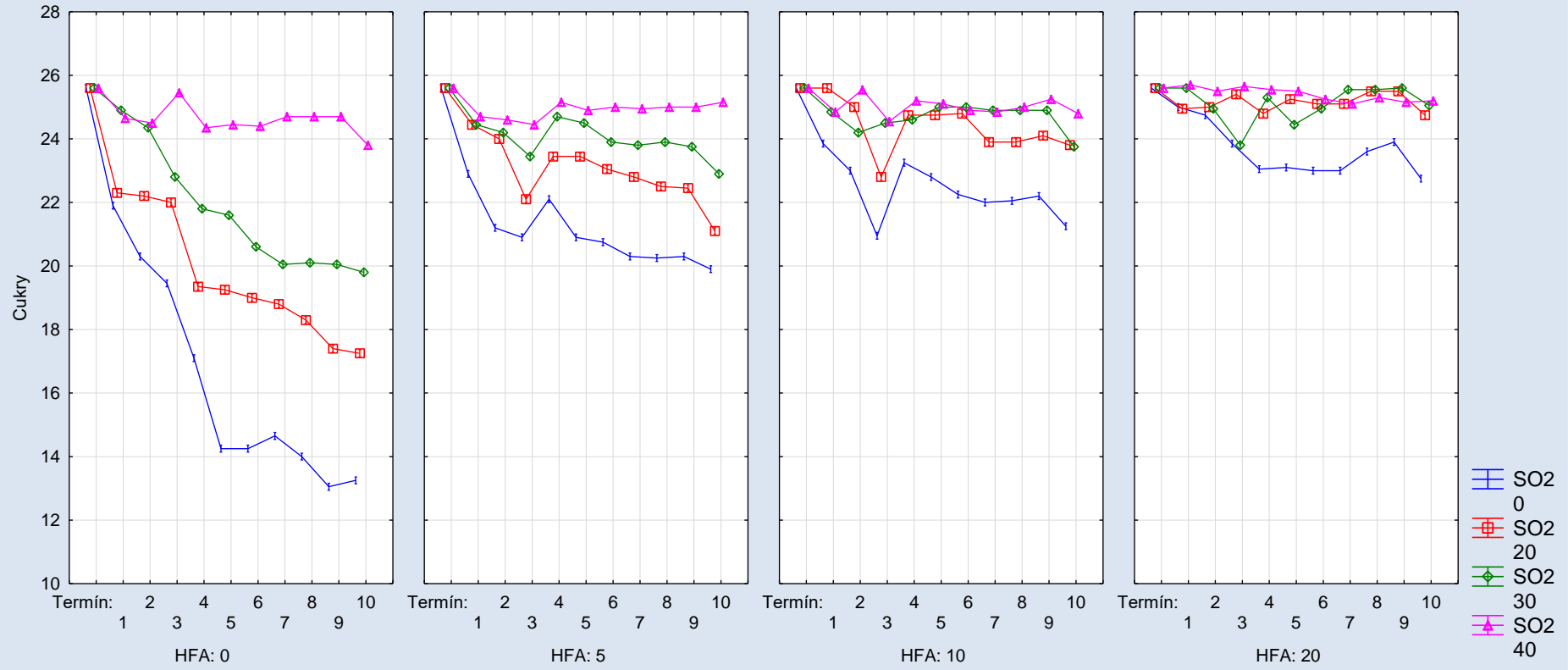


Graf 9: Účinnost vyšších mastných kyselin

Graf 5 je perfektní ukázkou efektivity vyšších mastných kyselin jako inhibitoru alkoholové fermentace. Z grafu můžeme vyčíst, že dávka 10 mg.l⁻¹ VMK kvašení potlačí až zcela zabrzdí. Změna obsahu zbytkového cukru byla u této koncentrace minimální. Ještě větší účinnost měla logicky vyšší dávka VMK, tedy 20 mg.l⁻¹ – u této dávky byla změna obsahu zbytkového cukru naprosto nevýznamná.

Termín*HFA**SO2"; Průměry MNČ
 Současný efekt: $F(150, 264)=46,823, p=0,0000$
 Dekompozice efektivní hypotézy
 Vertik. sloupce označ. +/- sm. chyby

56



Graf 10: Vývoj obsahu zbytkového cukru v závislosti na množství VMK, SO₂ a čas

V grafu 10 jsou porovnány všechny faktory, které by alkoholovou fermentaci a její ukazatel – tedy obsah zbytkového cukru – ovlivnit (v tomto případě zabrzdit). Pro přehlednost byly vynechány koncentrace 50 a 60 mg.l⁻¹ oxidu siřičitého, jelikož účinnost takové dávky byla prokázána již v předchozích grafech. Pro tento experiment je důležitější vliv vyšších mastných kyselin, který je potvrzen i v tomto souhrnném grafu. Již od dávky 5 mg.l⁻¹ VMK lze pozorovat zpomalení alkoholového kvašení, a to i při nulovém přídávku oxidu siřičitého. Nejúčinněji se samozřejmě jeví varianta s nejvyšší dávkou vyšších mastných kyselin a vyššími dávkami oxidu siřičitého, ale průkazné výsledky dokazuje i aplikace 10 mg.l⁻¹ VMK v kombinaci s 20, 30 a 40 mg.l⁻¹ oxidu siřičitého. Taková koncentrace je pro vinařský provoz zcela optimální, a to i v případě, že je cílem výroby víno v kategorii polosuché a snad i polosladké.

5 DISKUZE

V literární části jsou proti sobě postaveny dva základní kameny této diplomové práce. Na jedné straně byla objasňována problematika oxidu siřičitého, tedy látky, která je již mnoho let jednou z nejdůležitějších sloučenin při výrobě vína. Na straně druhé byla pozornost věnována moderní alternativě, která by mohla rapidně snížit dávky oxidu siřičitého – mluvíme zde o směsi vyšších mastných kyselin – oktanové, dekanové a dodekanové. Přestože bylo již před mnoha lety zjištěno, že mastné kyseliny mohou působit na alkoholovou fermentaci jak aktivačně (C_{16} a C_{18} (Rodriguez-Nogales, et al., 2013)), tak inhibičně (C_8 , C_{10} a C_{12} (Sacorreia, 1986)), plnou pozornost si tyto sloučeniny získaly až v posledních letech (Baroň, 2013; Bábiková, et al., 2012). Zrak je upřen hlavně na mastné kyseliny, které by mohly alkoholovou (případně i malolaktickou) fermentaci inhibovat – tedy na kyseliny kaprylovou, kaprinovou a laurovou. Zájem o látky, které by mohly dopomoci k redukci oxidu siřičitého ve víně, je logickým vyústěním snah člověka o zdravější životní styl, a to ve všech směrech, takže i ve vinařství.

Literární část je pouze shrnutím již zjištěných informací, jelikož princip fungování mastných kyselin, v jaké podobě je dnes znám, je ve své podstatě poměrně jednoduchý. Může nás to však navést k zamyšlení, co se s napadenou buňkou skutečně děje, jaký je detailní pohled na celý proces. Víme, že je buňka zdeformována, značné mezery jsou však ve výzkumech mezi aplikací vyšších mastných kyselin a onou deformací a následným úhynem buňky (kvasinky). Ve vícero pracích a studiích je funkčnost mastných kyselin C_8 , C_{10} a C_{12} potvrzena (Budínová, 2016; Baroň, 2013; Bábiková, et al., 2012; Viegas, et al., 1989; Viegas, et al., 1985), nikde se však nedočteme, co se s buňkou děje ihned po aplikaci VMK.

Vyšší mastné kyseliny však mají i své nevýhody. Studie dle Liua (2013) představuje efekt vyšších mastných kyselin nahromaděných během kvašení jako nežádoucí – způsobí totiž kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae* stres, který vede k jejich usmrcení a tím pádem nežádoucímu zastavení alkoholové fermentace.

Co je však pozitivem – jednomyslnost studií zabývajících se výzkumem vyšších mastných kyselin jako inhibitoru alkoholového kvašení, ať se jedná o zastavení

kvašení záměrné či nechtěné. Můžeme říct, že hypotéza byla potvrzena a nyní je ten pravý čas pro posun vpřed. Bylo by zajímavé ponořit se do problematiky hlouběji, prozkoumat konkrétněji děje, které probíhají v buňce těsně po aplikaci VMK. Je škoda, že v této diplomové práci, ať už v literární rešerši nebo praktické části, nebyl větší prostor pro detailnější popis procesů, zároveň je to však motivace pro další studie a výzkum.

Struktura experimentální části této práce byla poměrně jednoduchá, avšak výsledky průkazné. Efektivnost vyšších mastných kyselin byla potvrzena. Handicapem experimentu se stal úzký, respektive téměř žádný, záběr faktorů, které by na účinnost vyšších mastných kyselin mohly mít vliv.

Výsledky potvrzují již dříve vyřčenou vhodnou dávku VMK pro výrobu vína, tedy 10 mg.l^{-1} (Baroň, 2013), přičemž by dávka oxidu siřičitého mohla být snížena o několik desítek miligramů na litr. Otázkou však zůstává, jaká by potřeba síření později a zda by taková dávka dokázala zajistit mikrobiální stabilitu vína, aniž by došlo k refermentaci. Tato problematika souvisí také s možným vznikem rezistence kvasinky, která si v nevlídném prostředí může vybudovat vlastní obranný mechanismus. Dle Cabrala (2001) jsou kvasinky, které byly při svém vzniku vystaveny subletálnímu vlivu kyseliny oktanové, déle odolné k inhibičnímu vlivu mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem. Dále uvádí velmi zajímavý poznatek o tzv. „zkřížené rezistenci“, kdy je buňka sice napadená VMK a její permeabilita je zvýšena a může tak do jejího těla proudit etanol, který by mohl být pro kvasinku smrtelný, ale mírný stres, který etanol v buňce vyvolá, donutí kvasinku aktivovat obranný mechanismus, který využije k tomu, aby byla kyselina oktanová rychleji transportována z buňky ven. Záležitost toxicity a doby účinnosti vyšších mastných kyselin má tedy ve svém probádání jisté rezervy.

Neodbíhejme však od tématu a vraťme se k diskusi experimentální části této práce. Jak již bylo řečeno, experiment byl jasně průkazný, a to i přes jisté chyby v měření, kterým se za daných podmínek nešlo vyhnout. Řešením v takové situaci by bylo doplnit měření o další metodu, například HPLC (kapalinová chromatografie), která by výsledky zpřesnila. Mluvíme však o chybách v řádu desetin, což je pro dané účely zanedbatelná odchylka. Experiment by také mohl být doplněn o jednoduchý test mikrobiální stability, kdy by bylo pozorováno, při

jaké koncentraci VMK je možné ubránit víno před nežádoucí refermentací. Poskytlo by nám to celistvější pohled na vývoj vína a účinnost vyšších mastných kyselin ve větším časovém rozmezí. Poté by bylo možné zhodnotit dobu trvání inhibičního efektu vyšších mastných kyselin. A například s využitím sensorického hodnocení by pak pozorování vyšších mastných kyselin ve víně mohl takový rozsáhlejší experiment vést ke komplexnějším a ucelenějším výsledkům.

Budínová (2016) ve své práci uvádí, že dávka 20 mg.l^{-1} VMK bez přidaného SO_2 nebyla dostatečně účinná a tudíž pro vinaře nevýhodná, což by mohly potvrdit i výsledky této práce. V čem se však výsledky rozcházejí, je varianta s 5 mg.l^{-1} VMK a 60 mg.l^{-1} SO_2 . Zatímco v této práci byla dávka (i samotného SO_2) v tomto množství pro zastavení alkoholové fermentace zcela dostačující, v případě práce Budínové se jevila jako méně efektivní. Tento rozdíl by mohl být vysvětlen různým obsahem zbytkového cukru, při kterém byly VMK a SO_2 nadávkovány, přičemž v tomto experimentu byl obsah zbytkového cukru o cca 10-15 g.l^{-1} nižší.

Je velmi obtížné diskutovat výsledky, které mají jen málo možností k porovnání, přičemž i v těch několika možných srovnatelných případech bylo dosaženo obdobných závěrů.

6 VIZE DO BUDOUCNA

Problematika vyšších mastných kyselin (případně kyselin se středně dlouhým řetězcem) aplikovatelných do vína (moštu) za účelem inhibice alkoholové fermentace, refermentace nebo zvýšení mikrobiální stability vína byla nastíněna již před mnoha lety. V dnešní době výzkumy značně pokročily, stále však mluvíme o ne zcela probádané oblasti vinařského průmyslu. Vyšší mastné kyseliny se jeví jako slibný doplněk k oxidu siřičitému, jehož dávkování může být pomocí této látky výrazně sníženo. Prostor pro další zkoumání nám poskytuje jev vzniku rezistence, s čímž souvisí snižující nebo zvyšující se toxicita jednotlivých vyšších mastných kyselin. Je známo, že kvasinka dokáže aktivovat obranný mechanismus a přizpůsobit se tak nepřívětivému prostředí, stále však bojuje s protichůdným mechanismem, který dovoluje škodlivým vlivům napadnout buňku.

Neméně důležitou částí, která by stála za detailnější rozbor, je doba ihned po aplikaci vyšších mastných kyselin. Nabízí se nám otázka, co se přesně s buňkou děje hned po aplikaci a mezi konečným důsledkem, tedy úplnou deformací kvasinky. Jednalo by se o pozorování v řádu hodin – cca jeden den po aplikaci VMK. Náhled, který nám poskytuje několik předchozích studií, může být považován jako motivace pro další výzkum.

V navazujících výzkumech by bylo také zajímavé hodnotit, sledovat a následně porovnat různé vlivy, okolnosti a činitele, které by vyšší mastné kyseliny mohly podpořit nebo naopak inhibovat – například různé rody, kmeny či druhy kvasinek.

Velká mezera je výzkumech týkajících se organoleptických vlastností vyšších mastných kyselin a jejich hladiny sensorického vnímání. Několik studií již proběhlo, ale je problémem, že všechny dosud provedené studie (Ferreira, et al., 2000; Gómez-Míguez, et al., 2007) vychází z vodně-alkoholického roztoku. Za úvahu by stálo zvážení výzkumu s cílem stanovit prahy citlivosti přímo ve víně.

7 ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na potvrzení alternativní látky k oxidu siřičitému. Abychom však mohli nějakou zaručenou a léty osvědčenou metodu nahradit nebo upravit, je potřeba dokonale porozumět principu fungování – v našem případě tedy efektu oxidu siřičitého ve víně. Klady a zápory jsou shrnuty v literární části, připomeňme tedy jen nejpodstatnější fakta – oxid siřičitý dokáže zastavit alkoholovou fermentaci a zajistit mikrobiální stabilitu vína, ale riziko vzniku rezistence kvasinek a dalších mikroorganismů je nezanedbatelné, stejně tak jako možná zdravotní závadnost (viz kapitola 3.1.5). Není tedy divu, že redukce SO₂ patří k nejdiskutovanějším tématům současného vinařského světa.

Vyšší mastné kyseliny C₈, C₁₀ a C₁₂ (respektive mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem) byly studovány již před několika lety (Guilloux-Benatier, et al., 1998; Garbay, et al., 1995; Sacorreia, 1986; Viegas & Sá-Correia, 1997; Callul, et al., 1991; Cabral, et al., 2001) a jejich schopnost inhibice alkoholové fermentace a případně i zastavení nežádoucí malolaktické fermentace byla již v několika studiích potvrzena (Baroň, 2013; Budínová, 2016).

V této diplomové práci je pozornost směřována ke změně obsahu zbytkového cukru, podle které byla zhodnocena míra efektivity vyšších mastných kyselin při zastavování alkoholové fermentace. Bylo prokázáno, že množství oxidu siřičitého i při snaze vyrobit víno v kategorii polosladké (cca 25 mg.l⁻¹ zbytkového cukru), může být díky vyšším mastným kyselinám sníženo až o několik desítek miligramů. Ideální koncentrace přidávané směsi vyšších mastných kyselin je 10 mg.l⁻¹, přičemž taková dávka a způsob aplikace je přijatelný, jednoduchý a nebyl by finančně nákladný. Směs mastných kyselin tak představuje novou metodu výroby vína s vyšším zbytkovým cukrem, která není technologicky náročná a je tak vhodná i pro menší vinaře. Zároveň s sebou nese jen minimum rizik, jelikož vyšší mastné kyseliny jsou pro člověka přirozené a zdravotně nezávadné. Množství reziduí, které po aplikaci VMK ve víně zůstanou, se liší jen nepatrně od vín, do kterých VMK nadávkovány nebyly. Senzoricky se při šetrném dávkování nijak neprojeví. Směs vyšších mastných kyselin se tedy jeví jako ideální moderní pomocník při výrobě vína.

8 SOUHRN

Snahy o snížení množství oxidu siřičitého ve víně jsou předmětem vinařského zájmu již několik let. Výzkumy prováděné v posledních letech prokázaly účinnost nasycených vyšších mastných kyselin jako inhibitoru alkoholové fermentace, a to i při výrobě vína s vyšším zbytkovým cukrem.

Princip fungování mastných kyselin C₈, C₁₀ a C₁₂ je jednoduchý. Pronikají do těla kvasinky, kde následně změní jejich strukturu a buňka se tak stane propustnou pro další látky a tím pádem je nefunkční – kvasinka přestane pracovat a alkoholová fermentace je zastavena.

Směs vyšších mastných kyselin C₈, C₁₀ a C₁₂ v poměru 2:7:1 dokáže při aplikaci 10 mg.l⁻¹ snížit potřebnou dávku SO₂ o několik desítek mg.l⁻¹. Výsledky dokazují, že aplikace 10 mg.l⁻¹ směsi vyšších mastných kyselin v kombinaci s 30-40 mg.l⁻¹ SO₂ je stejně účinná jako dávka 60 mg.l⁻¹ SO₂.

Kromě prokazatelného účinku při zastavení alkoholové fermentace se směs VMK jeví slibně i jako prevence před refermentací (obzvláště u vín s vyšším zbytkovým cukrem).

Klíčová slova: mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem, alkoholová fermentace, kyselina oktanová, kyselina dekanová, kyselina dodekanová, oxid siřičitý

9 SUMMARY

Efforts to reduce sulphur dioxide in wine have been the subject of wine interest for several years. Research over recent years has shown the effectiveness of saturated higher fatty acids as an alcohol fermentation inhibitor, even in the production of wine with higher residual sugar.

The principle of the function of C₈, C₁₀ and C₁₂ fatty acids is simple. They enter the body yeast, which subsequently change their structure and the cell will become permeable to other substances, and thus is not working - yeast stops working and alcoholic fermentation is stopped.

The mixture of higher fatty acids of C₈, C₁₀ and C₁₂ in the ratio 2 : 7 : 1 can during application of 10 mg.l⁻¹ reduce the necessary dose of SO₂ to several tens mg.l⁻¹. The results show that administration of 10 mg.l⁻¹ of a mixture of higher fatty acids in combination with 30-40 mg.l⁻¹ SO₂ is as effective as a dose of 60 mg.l⁻¹ SO₂ itself.

In addition to the demonstrable effect of stopping alcohol fermentation, the HFA (resp. MCFA) mixture appears to be promising before referral (especially for wines with higher residual sugar).

Key words: middle chain fatty acids, alcoholic fermentation, octanoic acid, decanoic acid, dodecanoic acid, sulphur dioxide

10 REFERENCE

Alexandre, H., Mathieu, B. & Charpentier, C., 1996. Alteration in membrane fluidity and lipid composition, and modulation of H⁺-ATPase activity in *Saccharomyces cerevisiae* caused by decanoic acid. *Microbiology*, pp. 469-475.

Anneken, D. J. a další, 2002. *Fatty acids. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: autor neznámý

Bábiková, P., Baroň, M., Kumšta, M. & Sotolář, R., 2012. *Increasing the efficiency of sulphur dioxide in wine by using of saturated higher fatty acids*. 1 editor místo neznámé: Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis.

Balík, J., 1998. *Vinařství- návody do laboratorních cvičení*. 1 editor Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita.

Bardi, L., Cocito, C. & Marzona, M., 1999. *Saccharomyces cerevisiae* cell fatty acid composition and release during fermentation without aeration and in absence of exogenous lipids. *International Journal of Food Microbiology*, Issue 47, pp. 133-140.

Baroň, M., 2013. *Možnosti snížení obsahu oxidu siřičitého v technologii réвовých vín: Possibilities of sulfur dioxide reduction [i.e. reduction] in wine technology : původní vědecká práce*. 1. editor Brno: Mendelova univerzita v Brně: Folia Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis..

Baroň, M., 2013. Nová pomocná látka při zastavení alkoholové fermentace? Možná.... *Vinařský obzor*, Issue 106, pp. 632-634.

Barril, C., Clark, A. C. & Scollary, G. R., 2012. Chemistry of ascorbic acid and sulphur dioxide as an antioxidant system relevant to white wine. *Analytica Chimica Acta*, Issue 732, pp. 186-193.

Bartowsky, E. J., Francis, I. L., Bellon, J. R. & Henschke, P. A., 2002. Is buttery aroma perception in wines predictable from the diacetyl concentration?.. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Issue 3, pp. 180-185.

Bizaj, E. a další, 2012. A breeding strategy to harness flavor diversity of *Saccharomyces* interspecific hybrids and minimize hydrogen sulfide production. *Fems Yeast Research*, Issue 12, pp. 456-465.

Borrul, A. a další, 2015. New insights into the toxicity mechanism of octanoic. *Yeast*, pp. 451-460.

Budínová, D., 2016. *Použití nasyčených vyšších mastných kyselin v technologii vína, bakalářská práce*. Lednice: Mendelova univerzita v Brně.

Cabral, M. G., Viegas, C. A. & Sacorreia, I., 2001. Mechanisms underlying the acquisition of resistance to octanoic-acid-induced-death following exposure of *Saccharomyces cerevisiae* to mild stress imposed by octanoic acid or ethanol. *Arch. Microbiology*, pp. 301-307.

Callul, M., Borrul, F., Marce, R. M. & Zamora, F., 1991. HPLC analysis of fatty-acids in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, Issue 3, pp. 268-273.

Calvero, 2007. *Chemical structure of caprylic acid, aka octanoic acid*, místo neznámé: autor neznámý

Calvero, 2007. *Chemical structure of decanoic acid*, místo neznámé: autor neznámý

Capucho, I. & Sanromao, M. V., 1994. Effect of ethanol and fatty acids on malolactic activity of *Leuconostoc-oenos*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Issue 2-3, pp. 391-395.

Carel, M., 2011. *Wine from here*. [Online] Available at: <https://winobrothers.com/2011/10/11/sulfur-dioxide-so2-in-wine/> [Přístup získán 10. 11. 2016].

Comitini, F. & Ciani, M., 2007. The inhibitory activity of wine yeast starters on malolactic bacteria. *Annals of Microbiology*, Issue 57, 1, pp. 61-66.

Correia, I. S., Salgueiro, S. P., Viegas, C. A. & Novais, J. M., 1989. Leakage induced by ethanol, octanoic and decanoic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, Issue 5, pp. 123-127.

Corte, L. a další, 2012. Effect of pH on potassium metabisulphite biocidic activity against yeast and human cell cultures. *Food Chemistry*, 3(134).

- Divol, B., Miot-Sertier, C. & Lonvaud-Funel, A., 2006. Genetic characterization of strains of *Saccharomyces cerevisiae* responsible for 'refermentation' in Botrytis-affected wines. *Journal of Applied Microbiology*, Issue 3, pp. 516-526.
- Divol, B., Toit, M. d. & Duckitt, E., 2012. *Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts*, místo neznámé: autor neznámý
- Ferreira, V., López, R. & Cacho, J. F., 2000. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volume 80, pp. 1659-1667.
- Fic, V., 2015. *Víno - analýza, technologie, gastronomie*. 1. editor Český Těšín: Ing. Václav Helán - 2 THETA.
- Fredericks, I. N., Toit, M. d. & Krügel, M., 2011. Efficacy of ultraviolet radiation as an alternative technology to inactivate. *Food Microbiology*, Issue 28, pp. 510-517.
- Garbay, S., Rozes, N. & Lonvaufudel, A., 1995. Fatty acid composition of *Leuconostoc oenos*, incidence of growth conditions and relationship with malolactic efficiency. *Food Microbiology*, Issue 5, pp. 387-395.
- Geneix, C., Lafon-Lafourcade, S. & Ribereau-Gayon, P., 1983. The effect of fatty acids on the viability of *Saccharomyces cerevisiae*.. *Comptes Rendus De L Academic Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences*, Issue 19, pp. 943-947.
- Gómez-Míguez, M. J. a další, 2007. Volatile components of Zalema white wines. *Food Chemistry*, Svazek 100, p. 1464–1473.
- Grant-Preece, P., Fang, H., Schmidtke, L. M. & Clark, A. C., 2013. Sensrially important aldehyde production from amino acids in model wine systems: Impact of ascorbic acid, rythorbic acid, glutathione and sulphur dioxide. *Food Chemistry*, Issue 141, pp. 304-312.
- Guerrero., R. F. & Cantos-Villar, E., 2015. Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends in Food Science & Technology*, Issue 42, pp. 27-43.

Guilloux-Benatier, M., Le Fur, Y. & Feuillat, M., 1998. Influence of fatty acids on the growth of wine microorganisms *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Issue 20, pp. 144-149.

Henderson, P., 2009. Sulfur Dioxide: Science Behind this Anti-microbial. Issue 160.

Hui, Y. H. et al., 2007. *Handbook of Food Products Manufacturing: Principles, Bakery, Beverages, Cereals*,. New Jersey: y John Wiley & Sons, Inc..

Ishiwata, H., Nishijima, M. & Fukasawa, Y., 2003. Estimation of inorganic food additive (nitrite, nitrate and sulfur dioxide), antioxidant, processing agent and sweetener concentrations in foods and their daily intake based on official inspection result in Japan in fiscal year 1998. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, Issue 44, pp. 132-143.

Jackowetz, J. N. & Orduna, R. M. D., 2012. Metabolism of SO₂ binding compounds by *Oenococcus oeni* during and after malolactic fermentation in white wine. *International Journal of Food Microbiology*, Issue 155, pp. 153-157.

Jackowetz, J. N. & Orduna, R. M. D., 2013. Survey of SO₂ binding carbonyls in 237 red and white table wines. *Food Control*, Issue 32, pp. 687-692.

Jones, R. P., Pamment, N. & Greenfield, P. F., 1981. Alcohol fermentation by yeasts - the effect of environmental and other characteristics. *Process biochemistry*, pp. 42-49.

Krauss, G. & Forch, M., 1975. The influence of different fermentation methods on the formation of lower free fatty acids.. *Proc Am Soc Brew Chem*, pp. 37-41.

Lafon-Lafourcade, S., Geneix, C. & Riberau-Gayon, P., 1984. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty-acids produced by yeast and their elimination by yeast ghosts. *Applied and Environmental Microbiology*, Issue 61, 2, pp. 1246-1249.

Legras, J. L. a další, 2010. Activation of Two Different Resistance Mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae* upon Exposure to Octanoic and Decanoic Acids. *Applied and Environmental Microbiology*, Issue 22, p. 7526–7535.

Lesko, A., Kallay, M., Nyul-Puhra, B. & Nyitrai-Sardy, D., 2011. The change of polyphenolic composition and tyrosol content of the wine as an effect of sur lie method. *Acta Alimentaria*, pp. 79-90.

Liu, P. a další, 2013. *Membrane Stress Caused by Octanoic acid in*. místo neznámé: Iowa State University, Chemical and Biological Engineering Publications.

Malík, M., 2014. *Komplementární metody k použití oxidu siřičitého*. Brno: MENDELU Brno.

Michlovský, M., 2012. *Oxid siřičitý v enologii*. 1. editor Rakvice: Vinselekt Michlovský.

Mills, B., 2007. *Wikimedia Commons*. [Online] Available at: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sulfur-dioxide-3D-vdW.png> [Přístup získán 13. 11. 2016].

Ministerstvo zemědělství, 2012. *Bezpečnost potravin A-Z*. [Online] Available at: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92107.aspx> [Přístup získán 21. 4. 2017].

Mitchell, R. & Hall, C. M., 2008. *Wine Marketing: A Practical Guide*. Boston: Elsevier.

Murray, R. K., 2002. *Harperova Biochemie*. 23. (4. české) editor Jinočany: H&H.

Nair, M. K. a další, 2005. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *J Dairy Sci*, Issue 10, pp. 3488-95.

Nehme, N., Mathieu, F. & Taillandier, P., 2008. Quantitative study of interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Issue 7, pp. 685-693.

Peddie, H. A. B., 1990. Ester formation in brewery fermentations. *J Inst*, pp. 327-331.

Pezley, M., 2015. Production of Free Sulfur Dioxide by Wine Yeasts. *Interdisciplinary Undergraduate Research Journal*.

Pina, C., Santos, C., Couto, J. A. & Hogg, T., 2004. Ethanol tolerance of five non-Saccharomyces wine yeasts in comparison with a strain of Saccharomyces cerevisiae - influence of different culture conditions. *Food Microbiology*, Issue 21, pp. 439-447.

Rédei, G. P., 2008. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics*. 3 editor místo neznámé:Springer.

Rib'erau-Gayon., P., Dubourdieu, D., Don'eche, B. & Lonvaud, A., 2006. *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications*. 2. editor místo neznámé:John Wiley & Sons.

Rodriguez-Nogales, J. M., Vila-Crespo, J. & Fernandez-Fernandez, E., 2013. Immobilization of Oenococcus oeni in lentikats (R) to develop malolactic fermentation in wines. *Biotechnology Progress*, Issue 1, pp. 60-65.

Sacorreia, I., 1986. Synergistic effects of ethanol, octanoic, and decanoic acids on the kinetics and the activation parameters of thermal death in Saccharomyces bayanus. *Biotechnology and Bioengineering*, Issue 5, pp. 761-763.

Sajbidor, J., Malik, F. & Kissantalova, H., 1992. The relationship between the viability of selected dried wine yeast and their lipid-composition and fatty-acid profile. *Food Botechnology*, Issue 6, pp. 187-196.

Santos, M. C., Nunes, C., Saraiva, J. A. & Coimbra, M. A., 2012. *Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations*, místo neznámé: autor neznámý

Sedlo, J., 2009. [Online] Available at: <http://www.svcr.cz/strucny-vytah-zmen-nove-legislativy> [Přístup získán 19 4 2017].

Smrčka, J., 2013. *Použití oxidu siřičitého při výrobě vína*. Lednice: MENDELU Brno.

Son, H. S. a další, 2009. Metabolomic characterization of malolactic fermentation and fermentative behaviors of wine yeasts in grape wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Issue 11, pp. 4801-4809.

- Sonni, F., Chinnici, F. & Riponi, N. N. C., 2011. Pre-fermentation replacement of sulphur dioxide by lysozyme and oenological tannins: Effect on the formation and evolution of volatile compounds during the bottle storage of white wines. *Food Chemistry*, Issue 38, pp. 1193-2000.
- Taylor, G. T. & Kirsop, B. H., 1977. The origin of medium chain length fatty acids present in beer. *J. Inst. Brew*, pp. 241-243.
- Vanderrest, M. E. a další, 1995. The plasma-membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol Rev*, pp. 304-322.
- Viegas, C. A., Rosa, M. F., Sá-Correia, I. & Novais, J. M., 1989. Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, Issue 55, 1, pp. 21-28.
- Viegas, C. A. & Sá-Correia, I., 1991. Activation of plasma-membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic-acid. *Journal of General Microbiology*, Issue 137, pp. 645-651.
- Viegas, C. A. & Sá-Correia, I., 1997. Effects of low temperatures (9-33°C) and pH (3.3-5.7) in the loss of *Saccharomyces cerevisiae* viability by combining lethal concentrations of ethanol with octanoic and decanoic acids. *International Journal of Food Microbiology*, Issue 3, pp. 267-277.
- Viegas, C. A., Sá-Correia, I. & Novais, J. M., 1985. Synergistic inhibition of the growth of *Saccharomyces bayanus* by ethanol and octanoic or decanoic acids. *Biotechnology Letters*, Issue 7, pp. 611-614.
- Viegas, C. A. a další, 1994. Regulation of the expression of the H⁺-ATPase genes PMA1 and PMA2 during growth and effect of octanoic-acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression*, Issue 1217,1, pp. 74-80.
- Wells, A. & Osborne, J. P., 2012. Impact of acetaldehyde and pyruvic acid-bound sulphur dioxide on wine lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, Issue 54, pp. 187-194.
- Wikipedia, 2006. *Chemical structure of en: Lauric acid*, místo neznámé: Wikipedia.