

Mendelova univerzita v Brně
Zahradnická fakulta v Lednici



**VLIV SÍŘENÍ VÍNA NA VZNIK SLOUČENIN VÁZAJÍCÍ OXID SIŘIČITÝ VE
VÍNĚ**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce

Ing. Michal Kumšta

Vypracoval

Bc. Jakub Sikora

Lednice 2016

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Vliv doslazení moštů révy vinné medem a řepným cukrem na senzoričké vlastnosti vína vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona. Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Lednici dne:

Podpis



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatel : **Bc. Jakub Sikora**
Studijní program: Zahradnické inženýrství
Obor: Řízení zahradnických technologií
Název tématu: **Vliv šíření na vznik sloučenin vázajících SO₂ ve víně**
Rozsah práce: 75 stran , grafy, tabulky, chromatogramy

Zásady pro vypracování:

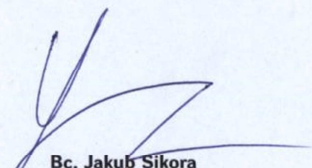
1. Prostudujte literaturu týkající se zadaného problému. Zaměřte se na vznik karbonylových sloučenin ve víně.
2. Mikrovínifikací získajte vzorky vína s odstupňovanou počáteční koncentrací oxidu siřičitého v moštu. Ve vzorcích stanovte základní analytické parametry, obsah karbonylových sloučenin a vzorky porovnejte i senzoričky.
3. Získané výsledky zpracujte vhodnou statistickou metodou a vyhodnoťte.

Seznam odborné literatury:

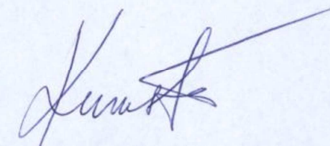
1. BRANCO, J M. – RIBÉREAU-GAYON, P. Handbook of enology. : The chemistry of wine stabilization and treatments. volume 2. Chichester, West Sussex, England. 2006. ISBN 97804700103962, 97804700103722. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/0470010398>.
2. RIBÉREAU-GAYON, P. – BRANCO, J M. Handbook of enology.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


Datum zadání diplomové práce: prosinec 2014

Termín odevzdání diplomové práce: květen 2016

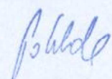

Bc. Jakub Sikora
Autor práce

L. S.


Ing. Michal Kumšta
Vedoucí práce


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




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

Poděkování

Chtěl bych touto cestou poděkovat rodičům za podporu při tvorbě této diplomové práce, dále panu Petru Dvořákovi za uvedení do oboru vinařství. V neposlední řadě vedoucímu mé diplomové práce panu Ing. Kumštovi za cenné rady a odborné vedení.

Obsah

Poděkování	5
1. Úvod	9
2. Literární přehled	10
2.1 Charakteristika SO ₂	10
2.2 Historie používání SO ₂	10
2.3 Vlastnosti SO ₂	13
2.4 Formy SO ₂ ve víně	14
2.4.1 Aktivní SO ₂	14
2.4.2 Volný SO ₂	15
2.4.3 Vázaný SO ₂	16
2.4.4. Endogenní SO ₂	16
2.5 Sloučeniny vázající SO ₂	18
2.5.1 Karbonylové sloučeniny	19
2.5.2 Acetaldehyd	19
2.5.3 Ketokyseliny	21
2.5.4 Acetoin a biacetyl	21
2.5.5 Cukry a jejich deriváty	24
2.5.6 Dikarbonylové molekuly	24
2.5.7 Jiné vazby	25
2.6 Vliv SO ₂ zdraví	26
2.7 Formy použití SO ₂	28
2.7.1 Spalování pevné síry	28
2.7.2 Plynný oxid siřičitý	28
2.7.3 Disiřičitan draselný	29
2.7.4 Síření pomocí vodných roztoků	29
3. Cíl práce	30

4. Experimentální část	31
4.1 Materiál	31
4.1.1 Výběr odrůdy.....	31
4.1.2 Charakteristika vybrané odrůdy 'Ryzlink rýnský'	31
4.1.3 Technologie experimentálních vín	33
4.1.4 Schéma experimentu	34
4.2 Metody měření	35
4.2.1 Měření pomocí přístroje ALPHA.....	35
4.2.2 Stanovení oxidu siřičitého titrací odměrným roztokem jódu	35
4.2.3 Stanovení kyseliny askorbové a reduktonů	36
4.2.4 Stanovení veškerých titrovatelných kyselin (EEC No 2676/90).....	37
4.2.5 Stanovení celkového asimilovatelného dusíku	38
4.2.6 HPLC analýza karbonylových sloučenin ve víně	38
5. Výsledky práce	40
5.1 Výsledky sensorické analýzy	40
5.1.1 Bodové hodnocení experimentálních vín	41
5.1.2 Sensorika analýza experimentálních vín	42
5.1.3 Sensorika analýza experimentálních vín	43
5.1.4 Sensorika analýza experimentálních vín	44
5.2 Měření volného SO ₂	45
5.2.1 Vývoj volného oxidu siřičitého ve vínech.....	45
5.2.2 Vývoj volného oxidu siřičitého ve vínech.....	46
5.2.3 Vývoj volného oxidu siřičitého ve vínech.....	47
5.2.4 Hodnoty veškerého oxidu siřičitého ve vínech	49
5.3.1 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 0-0.....	50
5.3.2 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 0-30.....	51
5.3.3 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 0-60.....	52

5.3.4 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 0-90.....	53
5.3.5 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 60-0.....	54
5.3.6 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 60-30.....	55
5.3.7 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 60-60.....	56
5.3.8 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 60-90.....	57
5.3.9 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 120-0.....	58
5.3.10 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 120-30.....	59
5.3.11 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 120-60.....	60
5.3.12 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 120-90.....	61
5.4 Analytický rozbor vín.....	64
5.4.1 Obsah kyseliny jablečné, mléčné a octové.....	65
6. Diskuze.....	66
7. Závěr.....	69
8. Souhrn	70
9. Resumé.....	70
10. Zdroje	71
11. Seznam tabulek	75
12. Seznam obrázků	75
13. Seznam grafů.....	75

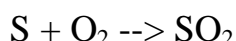
1. Úvod

I když lidé využívali oxid siřičitý při výrobě vína již ve starověku, je toto téma mezi technologi a vinaři pořád velmi žhavé. Jedním z hlavních důvodů je to, že je oxid siřičitý jedovatý a vysoce dráždivý plyn, ale především alergen. Mnoho lidem, tak může přivést zdravotní problémy po konzumaci vína. Vinaři jsou proto dle vinařského zákona limitováni celkovým obsahem veškerého oxidu siřičitého. Většinou se, ale vinaři ve vlastním zájmu snaží eliminovat SO_2 na minimální množství. Oxid siřičitý je konzervant vína, dále chrání a udržuje jeho organoleptické vlastnosti a potlačuje činnost mikroorganismů. Při běžné výrobě vína je tedy SO_2 nepostradatelným pomocníkem. Proto se vinařská odborná společnost stále zabývá vlastnostmi a účinky SO_2 na víno a mošt révy vinné. Mezi enology je proto oxid siřičitý otázka číslo jedna.

2. Literární přehled

2.1 Charakteristika SO₂

Oxid siřičitý je jedním ze dvou hlavních oxidů síry. Je to bezbarvý, štiplavě páchnoucí, jedovatý plyn. Průmyslově se připravuje spalováním síry.



Váže se s aldehydy a ketony. Oxid siřičitý se oxidací mění na oxid sírový. Ve vodném roztoku se mění na kyselinu siřičitou (H₂SO₃). Kyselina siřičitá se váže na acetaldehydy a cukry. Kyselina siřičitá se dále oxiduje na kyselinu sírovou (H₂SO₄).

Oxid siřičitý má desinfekční a bělicí účinky, používá se k desinfekci (tzv. síření) sudů a sklepních prostor pro skladování ovoce a zeleniny, k ošetřování osiv proti plísním a na bělení přírodních materiálů. (Michlovský, 2012)

2.2 Historie používání SO₂

Již před 4 tisíci lety v Egyptě jsou známy důkazy o používání oxidu siřičitého k bělení tkanin. Tehdy se u vína k dezinfekci používala pryskyřice a různé výluhy z rostlin, které zároveň ovlivňovali chuť a charakter vína.

Již ve starověku lidé poznali antiseptické vlastnosti síry. Už kolem roku 700 před Kristem se používala při konzervaci vína síra. Ve svých spisech uvádějí síru při vinifikaci Homér (800 před n. l.), Kato starší (234 - 149 před n. l.) a Plinius Starší.

Síra byla používána k ošetření vína jak v hliněných amforách, tak později v dřevěných sudech. U sudů mělo spalování síry dvojitý účinek, protože síra sloužila jak ke stabilizaci vína, tak ke konzervaci prázdných sudů.

V Evropě docházelo do konce 13. století ke klimatickému oteplování. To mělo za následek rozšíření vinařství a vinohradnictví do severnějších oblastí (Anglie, Belgie). Tato teplá období vyžadovala v důsledku zamezení naoctění čím dál tím větší síření. Problém byl prohlouben také křesťanskou církví, která ztratila používání pohanských bylin a výluhů. Proto se vinaři museli spolehnout jen na síru. V důsledku zmíněného klimatického oteplování v době od 9. do 13. století byla produkována vína s nižším obsahem kyselin, u kterých nebylo tak znatelné větší množství siřičitanů. Síření tedy v této době dosahovalo velmi vysokých dávek. Historici, zkoumající dokumenty z této doby, hovoří o přemrštěných dávkách až kolem 1000 mg.l⁻¹.

Od 14. století dochází v Evropě k chladnutí, tím se zvyšuje acidita vín a vnímání agresivních siřičitanů v chuti vína. Ke konci nadvlády Svaté říše Římské řada císařských výnosů zakazovala používání oxidu siřičitého ve víně. Tyto zákony však nebyly dodržovány. Porušení zákonů se těžko dokazovalo, protože nebyl žádný prostředek pro zjišťování siřičitanů ve víně. Zákazy byly odůvodněné tím, že přesířená vína vadila především spotřebitelům. Z historických spisů je možné vyvodit, že vína pravděpodobně obsahovala až desetkrát více siřičitanů než dnešní vína. Roku 1487 císař Maxmilián I. znovu zavedl legální používání síry. Definoval však také přísné omezení její dávky. Síření bylo omezeno na 16g síry na 1000 litrů vína. Zákon také informuje o přesné aplikaci síry. Síra byla mísená s pilinami na dně nádoby a spalována. Poté docházelo k plnění nádoby vínem. V roce 1498 v Bádensku došlo k upřesnění a zákazu přílišného síření vín v takzvaných „*Pravidlech a předpisech o víně*“.

Během klimaticky chladného období mezi 15-18. stoletím docházelo stále častěji k výrobě příliš kyselých vín a to hlavně v severnějších oblastech. V důsledku toho docházelo k mizení severnějších vinic. Z důvodu velké acidity byla vína přírodně stabilní a nedocházelo k tak výraznému síření a koncentrace siřičitanů výrazně klesla. Kvůli velké aciditě vín došlo k vrcholu toxicity vinařské chemie. Do vín se začal přidávat octan olovnatý, aby víno bylo „zakulacené“ a méně náchylné na vznik chorob a aby si mohlo zachovat přírodní zbytkový cukr. Kvůli přidávání octanu olovnatého celá Evropa trpěla bolestmi, které později nebyly připisovány siřičitanům, ale právě již zmíněné toxické látky. V Německu v roce 1696 byla situace na takové úrovni, že vévoda Wurttenberský vydal zákon, který jakékoliv přidávání olova do vína trestal smrtí.

Od 19. století dochází zpětně k oteplování evropského kontinentu. Vína ztrácí přehnaně vysokou aciditu. Ustoupila nutnost používání octanu olovnatého. Víno díky

nižším kyselinám ztrácí také stabilitu. Víno se zase dostalo do stadia mikrobiologického rozvoje a chorob. Pasteur se v roce 1863 snaží o objevení metody konzervace vín. K ošetřování vín pomocí oxidu siřičitého navrhuje také filtraci. Filtrace odstraňuje z vína „mikroby“ a aplikace síry zajišťuje vínu stabilitu a zdravý vývoj.

Od konce 19. a začátku 20. století je známo působení oxidu siřičitého na mikroorganismy a enzymy a první inaktivační mechanismy sloučenin. Kolem roku 1910 byla zaznamenána většina metod síření. Vznikají zákonné předpisy udávající maximální možnou dávku SO₂ ve víně. V polovině 20. století byla prokázána pouze účinnost molekulárního SO₂ .(Kraus, 2009, Michlovský, 2012)

2.3 Vlastnosti SO₂

Oxid siřičitý je nenahraditelným pomocníkem při moderním zpracování hroznů na víno. Mezi jeho přední vlastnosti řadíme antioxidační a antiseptické účinky.

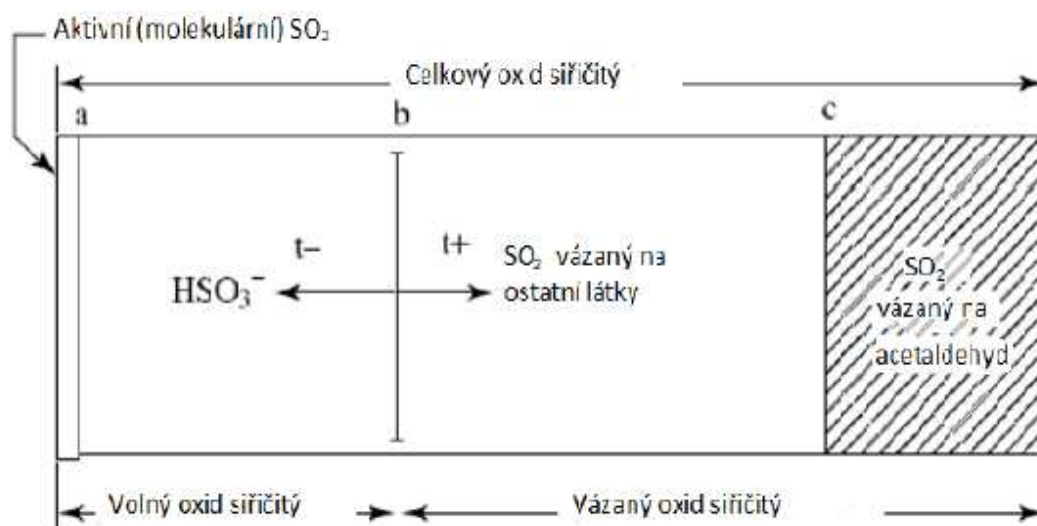
Oxid siřičitý chrání mošt a víno, před chemickou oxidací. Za chladných teplot je tato reakce velmi pomalá. Proti enzymatické oxidaci je tedy oxid siřičitý málo platný. SO₂ dále chrání vína před příliš intenzivní oxidací fenolových substancí a některých aromatických složek. Dále zajišťuje nízkou hladinu oxidoredukce. Další důležitá vlastnost SO₂ je bělicí účinek, který sledujeme především u červených vín. Je to důsledek chemické redukce hnědých sloučenin pocházejících z oxidací nebo ze změn struktur antokyanů a tříslovin. Po poklesu volného SO₂, který reaguje s reaktivnějšími složkami, např. acetaldehydem se původní barva částečně vrací.

Dále oxid siřičitý reaguje s plynným nebo rozpuštěným kyslíkem a oxiduje se na sírany, tato reakce je katalyzována ionty železa nebo mědi. Sírany mohou způsobovat „vysušování“ vína, tzn. dodá mu nepříjemné tóny tvrdosti až kovovosti.

Další důležitou vlastností oxidu siřičitého jsou jeho antiseptické účinky. SO₂ inhibuje rozvoj mikroorganismů, ve vyšších dávkách dokonce způsobuje jejich smrt. Daná koncentrace však vyvolá destrukci dané populace v určitém množství ale ne celého množství. SO₂ blokuje růst bakterií, aniž by narušil jejich životaschopnost. Po snížení koncentrace SO₂, nebo opět v příznivých podmínkách, se bakterie mohou stát znovu aktivními. Účinnost SO₂ je větší na bakterie než na kvasinky. Při malé dávce je jeho účinnost přechodná. Účinnost dané dávky se zvyšuje snížením původní populace, např. filtrací. Během skladování vína působí SO₂ proti všem mikroorganismům, hlavně proti kvasinkám, mléčným bakteriím a v menší míře proti octovým bakteriím a také zabraňuje tvorbě zákalů způsobených kvasinkami, refermentaci sladkých vín, rozvoji *Brettanomyces*, křísotvorných kvasinek a bakteriálních chorobám. (Michlovský, 2012)

2.4 Formy SO₂ ve víně

Ve víně se oxid siřičitý vyskytuje v několika formách, především to jsou formy volného, vázaného a aktivního oxidu siřičitého.



Obr. 1: *Formy oxidu siřičitého ve víně*

2.4.1 Aktivní SO₂

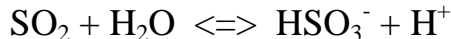
Zdá se, že největší účinky, zvláště proti mikroorganismům, má volný SO₂, avšak není tomu tak. Podstatnější jsou účinky molekulárního SO₂ také nazývaného jako aktivní SO₂. Aktivita aktivního SO₂ z volného SO₂ se zvyšuje se zvýšením teploty, dále se zvyšuje snížením pH. Konkrétně se zvýší asi o 25% s +0,1 hodnoty pH, u teploty je toto zvýšení aktivity o 7% s +1°C Tento fakt ukazuje následující tabulka.

Tabulka 1 *Nárůst aktivního oxidu siřičitého* (Blouin, 1995)

Parametr	Změna parametru	Nárůst aktivního SO ₂
Obsah alkoholu	+ 1 % obj. alkoholu	+ 5 %
Teplota	+ 1 °C	+ 7 %
pH	-0,2	+ 50 %

2.4.2 Volný SO₂

Jedná se o iont kyselého siřičitanu (HSO₃⁻). Představuje podíl kyseliny, která je neutralizována zásadami. Je tedy ve formě plně ionizovaných solí. V enologii používáme pojmy jako „volný oxid siřičitý“ nebo „dioxid síry“. Volný oxid siřičitý, čili kyselý siřičitan, vzniká reakcí molekulárního oxidu siřičitého s vodou v kyselém prostředí (3-4 pH). Vzniká tedy hydrogensiřičitanový anion a vodík.



Volný oxid siřičitý je částí siřičitanů přímo oxidovatelný jodem. Podíl volného SO₂ nezávisí na pH, vyjadřuje přebytek SO₂, který se nevázal se složkami vína. Je užitečný svou antioxidační kapacitou, dále je schopen se vázat s acetaldehydem a odstranit jeho charakteristický zápach. Může se také vázat s barevnými látkami vína a snižovat barvu vín. Pojetí volného a molekulárního oxidu siřičitého je potřeba hodnotit současně ve vztahu k mikrobiologické stabilitě a ke kapacitě absorbovatelného kyslíku. Množství volného SO₂ musí být regulováno podle požadované ochrany proti oxidaci. Zatímco koncentrace molekulárního SO₂ se upravuje podle cílených mikroorganismů a dále také podle chuťových vlastností vína. (Michlovský, 2012)

2.4.3 Vázaný SO₂

Vázaný oxid siřičitý je součtem všech siřičitanů vázaných na jednotlivé sloučeniny vína. Vázaný SO₂ nemá velký technologický význam, nepůsobí antioxidačně, ani na kvasinky, ale má vliv na rozvoj mléčných bakterií, vzhledem k obsahu vázaného SO₂, aby byl blokován rozvoj mléčných bakterií, je toto irelevantní.

Vázaný oxid siřičitý je takzvaná „paměť vývoje vína“. Udává kvalitu hroznů a následné enologické práce. Hladina vázaného a volného SO₂ je přímo úměrná technologickým postupům ve vinařství. Čím menší je koncentrace celkového SO₂, tím je přístup vinaře k pěstování hroznů a technologii vína šetrnější. Znamená to důkladnější přístup a ošetřování pěstovaných hroznů, lepší kontrolu nad hygienou ve sklepních prostorách a samotném víně a také správné uložení vína (manipulace bez přístupu vzduchu).

Nejlepší vinařem z tohoto pohledu je ten, který s úspěchem produkuje velké víno, plného výrazu typičnosti oblasti s nejmenší koncentrací SO₂. Není přirozeně žádnou zásluhou předložit víno sice bez siřičitanů, ale naoxidované nebo nemocné (Michlovský, 2012)

2.4.4. Endogenní SO₂

Je to forma oxidu siřičitého, kterou obsahují vína bez přídavku žádné formy oxidu siřičitého. Endogenní SO₂ vzniká enzymatickou činností kvasinky.

Do bobule se síra transportuje přes floém a akumuluje se v ní během růstu a zrání, především v semenech. Síra se v bobulích vyskytuje ve formě SO₄²⁻, kdy tuto formu mohou pohotově redukovat na sulfid, který se dále asimiluje do cysteinu, který kvasinky dokáží zpracovat. (Michlovský, 2014b)

Kvasinky transformují málo se vyskytující elementární síru na sirné aminokyseliny (cystein, cystin, metionin, glutation) a jeho deriváty – sírany. Produkce

této formy oxidu siřičitého se pohybuje od několika mg.l^{-1} až po 40 mg.l^{-1} . Vyšší tvorbu endogenního SO_2 zaznamenáváme zřídka a to u vín z čirého fermentačního prostředí. Tvorba endogenního SO_2 dále závisí na kmenu kvasinek. Vysokou tvorbu zaznamenáváme u kvasinek citlivých na SO_2 , které jsou inhibovány zasiřením moštu. Naopak existují uměle vyselektovány kvasinky, které mají práh odolnosti vyšší. (Michlovský, 2014b)

2.5 Sloučeniny vázající SO₂

Oxid siřičitý na sebe váže velké množství látek, primárně to jsou karbonylové sloučeniny s aldehydovou a ketonovou funkcí. Celý proces je dosud málo prozkoumanou záležitostí.

Sloučeniny obsažené v mošttech, které se váží na SO₂ jsou kyselina pyrohroznová, kyselina oxoglutarová a v malém množství glukóza. V případě hroznů intenzivně postižených hnilobami, plísní šedou, ale i jinými hnilobami, zajišťujeme přítomnost mnoha dalších sloučenin silně vázajících SO₂. V těchto podmínkách jsou vazby SO₂ důsledkem rozvoje různých plísní na hroznech, především pak octových bakterií. U bílých vín to je ještě acetaldehyd. Zvláště u červených vín se na SO₂ vážou antokyany a fenolové sloučeniny.

2.5.1 Karbonylové sloučeniny

Karbonylové sloučeniny jsou fermentačního původu, zůstávají ve vínech jen ve stopovém množství. Vznikají ve velkém množství během dekarboxylace α -ketonových kyselin, ale snadno se slučují s oxidem siřičitým nebo s alkoholy a tvoří acetáty. Sloučeniny, které ve víně můžeme nalézt, jsou aldehydy a ketony (Michlovský, 2012). Ze skupiny aldehydů můžeme ve víně nalézt: acetaldehyd, propanal, hexanal, fenylacetaldehyd, z ketonů to jsou hydroxypentanon, diacetyl a acetoin.

2.5.2 Acetaldehyd

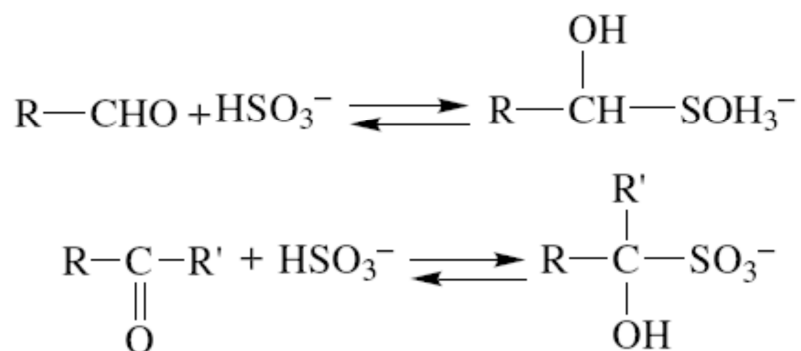
Acetaldehyd je reaktivní, s nízkou molekulární hmotností, sensoricky rozpoznatelná sloučenina, vyskytující se v potravinách a různých nápojích. (Bottazzi, a kol., 1973) Kvantitativně je to nejvýznamnější karbonylová sloučenina, která vzniká jako meziprodukt při alkoholové fermentaci. Sensoricky ho vnímáme jako čerstvě nakrájené zelené jablko, čerstvě posečenou trávu nebo vlašské ořechy. (Margalith, 1981) Sensoricky je acetaldehyd detekovatelný již při koncentracích 100 až 125 mg.l⁻¹. (Zoecklein, 1995) Acetaldehyd může být také produkován po alkoholové fermentaci chemickou oxidací etanolu, kdy je víno vystaveno kontaktu se vzduchem. (Danilewicz, 2003)

Obsah acetaldehydu ve víně je v rozmezí 30 až 130 mg.l⁻¹ a odpovídá vázanému SO₂ v hodnotách 44-190 mg.l⁻¹, a proto je nejvýznamnější molekulou, která váže oxid siřičitý. (Baroň, 2013)

Ve víně, kde je nižší obsah volného SO₂, uvolňuje nízká disociace kyseliny aldehyd-sírové stopy acetaldehydu. Tato reakce má za následek stopy zvětralosti ve víně. Důležitým poznatkem je nepřítomnost volného acetaldehydu ve víně, jestliže víno obsahuje volný SO₂.

Acetaldehyd se váže na oxid siřičitý za vzniku acetaldehyd-kyseliny siřičité. Tato vazba je velmi silná a skoro nevratná. Vazba acetaldehydu probíhá velice rychle.

Například při pH 3,3 dosahuje vázání SO₂ na acetaldehyd až 98 % během 90 minut. Po dalších pěti hodinách je vázání již zcela ukončeno. (Michlovský, 2012)



Obr. 2: *Reakce aldehydové skupiny s volným SO₂*

Vázaný acetaldehyd však může degradovat vlivem činnosti mléčných bakterií, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus*, aj. Tato mikrobiální činnost tedy degraduje acetaldehyd na alkohol a kyselinu octovou. (Flamini, 2002) Bylo zjištěno, že degraduje volná i vázaná forma acetaldehydu na SO₂, to má za následek snížení veškerého oxidu siřičitého ve vínech. (Osbourne, 2000)

Nejvyšší koncentrace acetaldehydu se vyskytují za přítomnosti volného SO₂ a aktivní kvasinky. Hodnoty acetaldehydu jsou větší při zdlouhavých fermentacích a při nedostatku thiaminu. Tvorba acetaldehydu je totiž obranným mechanismem kvasinky právě proti volnému SO₂. Proto hlavně síření rmutu nebo moštu rozhoduje o podílu vázaného SO₂ ve víně. (Ribéreau-Gyoun a kol., 2006b)

2.5.3 Ketokyseliny

Ve víně se pravidelně vyskytují kyselina pyrohroznová a kyselina 2-oxoglutarová. Jsou to sekundární produkty alkoholové fermentace. Mohou sehrávat významnou roli v podílu kombinací SO₂. Kyselina pyrohroznová se ve víně běžně vyskytuje v koncentracích od 10 – 500 mg.l⁻¹, kyselina 2-oxoglutarová pak 2 – 350 mg.l⁻¹. (Usseglio-Tomasset, 1995)

Množství oxidu siřičitého vázaného těmito substancemi může být velmi různé, ve vínech pocházejících z botrytizovaných hroznů jsou schopny navázat průměrně 43 mg.l⁻¹ u kyseliny 2-oxoglutarové a 58 mg.l⁻¹ u kyseliny pyrohroznové. Vytváření těchto kyselin začíná již při začátku fermentačního procesu. S dokončující fermentací tvorba těchto kyselin ustává. Takto se vysvětlují jejich vyšší koncentrace ve sladkých vínech v porovnání se suchými. Provdušnění při vyšší teplotě a vyšším pH napomáhá k tvorbě a akumulaci ketokyselin. V řadě fermentací napomáhá přídavek Thiaminu v dávce 0,5 mg/l, snižuje tak koncentraci těchto kyselin. Thiamin představuje hlavní prvek karboxylázy, která zabezpečuje dekarboxylázu kyseliny pyrohroznové na acetaldehyd. Dá se říci, že nedostatek thiaminu způsobuje akumulaci ketokyselin, zvláště u nahnilých hroznů. Především u sladkých a fortifikovaných vín si tímto opatřením relativně snížíme potencionální vázaný SO₂ až o 20 mg.l⁻¹. K dosažení dobré účinnosti se thiamin přidává do odkaleného a zasiřeného moštu. V některých případech byly zjištěny i pozitivní sekundární účinky: aktivace fermentace a pokles těkavých kyselin. Thiamin se přidává ve formě thiamin hydrochlorid. (Michlovský, 2012)

2.5.4 Acetoin a biacetyl

Tyto látky řadíme mezi hydroxykarbonylové a dikarbonylové sloučeniny. Lze je považovat za produkty oxidace glykolů a jiných polyolů, vznikají však různými způsoby. Acetoin a biacetyl vznikají především jako vedlejší produkty při jablečno-mléčné fermentaci. Tyto sloučeniny bývají doprovázeny butan-2-3-diolem, který vzniká redukcí acetoinu. Acetoin a biacetyl a jeho homology mají ostrou dráždivou vůni a chuť ve zředění připomínající máslo. (Velíšek, 2002) Acetoin může být

produkován také jako vedlejší produkt alkoholové fermentace, kdy je jeho sensorický projev spíše mléčný. Často se vyskytuje např. u odrůdy Chardonnay, kde je jeho práh vnímání (5 mg.l^{-1}) nejnižší. (Michlovský, 2012)

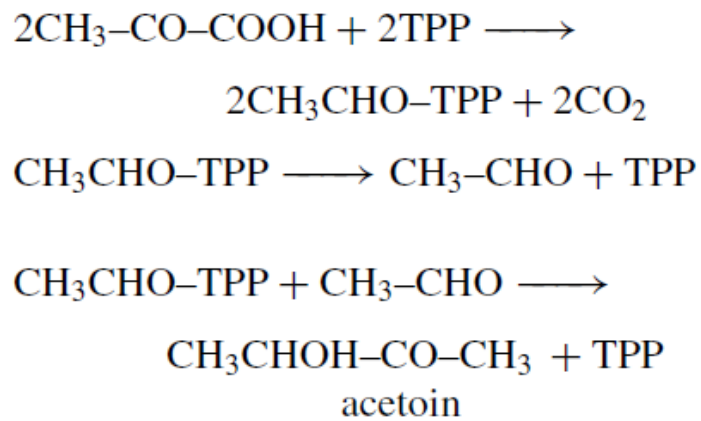
Produkce acetoinu a biacetylu kvasinkami začíná reakcí kondenzací dvou molekul kyseliny pyrohroznové za přítomnosti thiamin-pyrofosfátu a za vzniku aktivního acetaldehydu. Z tohoto acetaldehydu a další molekuly kyseliny pyrohroznové vzniká acetolaktát. Z něj se oxidativní dekarboxylací produkuje diacetyl a neoxidativní formou dekarboxylace acetoin. Tento proces probíhá po celou dobu alkoholové fermentace, po jeho ukončení se vytvořený diacetyl velmi rychle redukuje na acetoin, nebo až na 2,3-butandiol. Ležení vína na kvasničných nebo bakteriálních kalech urychluje tuto redukci. (Ribéreau-Gayoun a kol., 2006)

Koncentrace diacetylu a acetoinu vyprodukovaných při alkoholové fermentaci je nízká a nedosahuje takové úrovně, abychom je sensoricky vnímali. Většina kmenů *Sacharomyces cerevisiae* produkuje nízké množství acetoinu (do 12 mg.l^{-1}). (Romano a Suzzi, 1996). Diacetyl vzniká při metabolizaci aminokyselin v průběhu alkoholové fermentace, ale díky diacetylreduktáze je přeměněn na acetoin.

Beze sporu největšími producenty acetoinu a biacetylu, jsou bakterie různých rodů, především bakterie mléčného kvašení. Ty dokáží degradovat i kyselinu citronovou, čili obecně bakterie syntetizují více daných látek nežli kvasinky.

První metabolická dráha vzniku acetoinu a diacetylu, je reakce acetylkoenzymu A s aktivním acetaldehydem katalyzovaná diacetylsyntázou, tu se však dosud nepodařilo izolovat. Druhá dráha představuje produkci acetoinu dekarboxylací z acetolaktátu, kdy jeho oxidací může vznikat diacetyl. Vliv na množství syntetizovaných látek má druh *Oenococa*, podmínky malolaktické fermentace a množství degradované kyseliny citronové.

Acetoin může být produkován i octovými bakteriemi z kyseliny mléčné. (Kratochvil, 2013) Další zdroj uvádí, že acetoin je produkován octovými bakteriemi z pyruvátu. Pyruvát se dekarboxyluje v přítomnosti thiamin-pyrofosfátu (TPP) a vede k tvorbě ethanalového-TPP. V reakci ethanalů s ethanal-TPP následně vzniká acetoin. (Ribéreau-Gyoun a kol., 2006b)



Obr. 3: Dekarboxylace pyruvátu na acetoin octovými bakteriemi (Ribéreau-Gyoun a kol., 2006)

2.5.5 Cukry a jejich deriváty

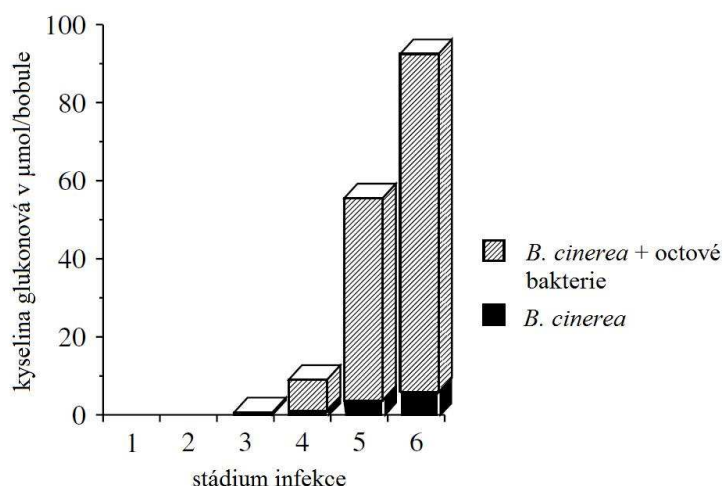
V molekulách různých cukrů existují aldehydicke a ketofunkce, je možné očekávat, že jsou schopné vázat oxid siřičitý. Pozorujeme, že fruktóza a sacharóza prakticky nereagují. Arabinóza reaguje, ale vzhledem k nízkým až zanedbatelným koncentracím se na tento fakt nebere ohled. Naopak glukóza má vliv na interpretaci poklesu volného SO_2 – 1g glukózy váže 0,3 mg SO_2 při koncentraci 50 mg.l^{-1} volného oxidu siřičitého. Vzhledem k velkému podílu glukózy v moštích a v likérových vínech je potřeba s tímto faktem počítat. Důležitou sloučeninou je keto-5-fruktóza (5-oxofruktoza). Tato substance se vyskytuje v řádově stovek mg.l^{-1} právě v moštích botrytických hroznů. Produkují ji z fruktózy octové bakterie typu *glukonobacter*. Její koncentrace vzrůstá se zvyšující se schopností vázat SO_2 . Obsah této sloučeniny se nemění fermentací, pro nízkou koncentraci této látky je zapotřebí pracovat se zdravým materiálem. (Michlovský, 2012)

2.5.6 Dikarbonylové molekuly

V hroznech zasáhnutých hnilobou se vyskytuje poměrně méně významná koncentrace molekul s dvěma karbonylovými skupinami. Tvoří se zřejmě v důsledku rozvoje *Botrytis cinerea* a jiných mikroorganismů, které operují v různých stádiích hniloby. Jde převážně o glyoxal a methylglyoxal. Jejich koncentrace nepřesahuje 3 mg.l^{-1} . Glyoxal přispívá bezvýznamně k bilanci vázání SO_2 . Podíl metylglyoxalu je naopak větší a může mít na svědomí vázání více než 50 mg.l^{-1} SO_2 z koncentrace 50 mg.l^{-1} volného oxidu siřičitého (Michlovský, 2012). Koncentrace glyoxalu a methylglyoxalu ovšem rapidně klesá při alkoholové fermentaci, proto mají tyto dvě uvedené sloučeniny ve vínech při vázání SO_2 jen zanedbatelnou roli. (Sainade, *Et. All*, 2013).

2.5.7 Jiné vazby

Další substance, které mohou vázat oxid siřičitý v malém množství, jsou: kyselina glukonová a galakturonová. Kyselina galakturonová je karbonylová sloučenina hroznového původu, ve větších koncentracích se vyskytuje ve vínech, kdy byl mošt delší dobu v kontaktu se slupkou bobule, čili převážně v červených vínech. (Sponholz, 1985) V napadených hroznech plísní šedou - *Botrytis cinerea*, vzniká kyselina glukonová. Její obsah se zvyšuje s činností octových bakterií, které se rozmnožují na sladké šťávě unikající z prasklinek vyvolaných prorostením *B. cinerea* na povrch bobule. Koncentrace kyseliny glukonové závisí na napadení *B. cinerea*, nebo i octových bakterií. Velké koncentrace této kyseliny vznikají činností octových bakterií, které zpracovávají glycerol na dihydroxyaceton. *Gluconobacter sp.* oxiduje glukózu pomocí membránové dehydrogenázy. Odbourávání cukrů je posléze významné pro akumulaci glukonových kyselin, 2-oxo- a 5-oxoglukonové a 2,5 dioxoglukonové. Tento jev vzniku ketonových sloučenin má velký význam pro potenciální vazby s oxidem siřičitým v moštu. (Michlovský, 2012)



Graf 1: Vývoj koncentrace kyseliny glukonové vlivem napadení bobule *B. cinerea* a kombinací s octovými bakteriemi (Ribéreau-Gayoun a kol., 2006b)

Mezi ostatní sloučeniny, které se mohou vázat na SO₂ patří: kyselina glyoxylová, kyselina oxaloctová, glykolaldehyd, 5-(hydroxymetyl)furfural. Jejich jednotlivý podíl je však velmi malý, a proto mají při celkové bilanci oxidu siřičitého ve víně malý vliv. Další sloučeniny, které váží oxid siřičitý, jsou antokyany a další fenolové sloučeniny. (Michlovský, 2012)

2.6 Vliv SO₂ zdraví

V posledních letech je v enologické společnosti kladen důraz na snížení veškerého oxidu siřičitého ve vínech a dále se hledají a testují různé alternativy jeho nahrazení. Příčinou tohoto přetrvávajícího zájmu o SO₂ je fakt, že je to alergen a při vyšších koncentracích může způsobit zdravotní problémy. Z tohoto důvodu se oxid siřičitý musí označovat jako „oxid siřičitý“ a „siřičitany“ na obalu, překročí-li koncentraci 10 mg.l⁻¹. Vzhledem k endogennímu SO₂ a k přirozené syntéze SO₂ samotnými kvasinkami při alkoholové fermentaci, je toto označení platné pro všechny vína, paradoxně i pro vína, kde nebyl přidán samotný SO₂.

Dalším důvodem jsou nedávno oznámené alergické reakce na siřičitany, které se projevují již při nízkých požitých dávkách (řádově mg.l⁻¹). Týkají se především skupiny lidí trpící astmatem. (Snelten, 1992) V neposlední řadě, je fakt, že největší podíl vázaného oxidu siřičitého tvoří kyselina acetaldehyd-siřičitá, která je zdrojem bolestí hlavy, především u citlivých osob. Proto existují normy pro veškerý oxid siřičitý obsažený ve víně. Jelikož Česká republika je stát patřící do evropské unie, přijali jsme a zavedli společné normy, které stanovuje Nařízení rady (es) č. 479/2008 ze dne 28. Dubna 2008 o společné organizaci trhu s vínem příloha V a Nařízení komise č. 607/2009 ze dne 10. Července 2009. Tyto nařízení stanovují hranice pro obsah celkového oxidu siřičitého ve vínech vyrobených v ČR.

- U tichých vín nesmí celkový obsah SO₂ překročit:
 - 160 mg.l⁻¹ u červených vín
 - 200 mg.l⁻¹ u bílých a růžových vín

- Jestliže je v tichých vínech obsah cukru vyjádřený jako součet glukosy a fruktózy vyšší než 5 g.l^{-1} , tak celkový SO_2 nesmí překročit:
 - 200 mg.l^{-1} červených vín
 - 250 mg.l^{-1} u bílých a růžových vín
- Zvýšené hodnoty pro vína s původem v ČR s přívlastkem:
 - 300 mg.l^{-1} pro pozdní sběr
 - 350 mg.l^{-1} pro výběr z hroznů
 - 400 mg.l^{-1} pro výběr z bobulí, výběr z cibéb, slámové a ledové víno
- V likérových vínech nesmí celkový oxid siřičitý překročit tyto hodnoty:
 - 150 mg.l^{-1} u likérových vín s obsahem cukru do 5 g.l^{-1}
 - 200 mg.l^{-1} u likérových vín s obsahem cukru nad 5 g.l^{-1}
- U vín šumivých je horní hranice SO_2 nastavena na:
 - 185 mg.l^{-1} u jakostních šumivých vín
 - 235 mg.l^{-1} u všech ostatních šumivých vín

Zvýšené hladiny SO_2 byly spojeny s nežádoucími účinky u citlivých spotřebitelů, které by se mohly podobat astmatické reakce (Snelten, 1992).

Podle přílohy č. 1 k vyhlášce č. 113/2005 Sb. Ve znění pozdějších předpisů (vyhláška č. 117/2011 Sb.) je však oxid siřičitý považován za alergen a jako takový se musí (podle §8 odstavce 10 téže vyhlášky) uvádět na obalu. A to jak oxid siřičitý, tak i siřičitany v koncentracích vyšších než 10 mg.kg^{-1} nebo 10 mg.l^{-1} , vyjádřeno jako SO_2 . (Vyhláška č. 113/2005 Sb.) Podle nového prováděcího nařízení Komise EU č. 579/2012 může nařídit stát doplnění označení o patřičný piktogram.



Obr. 4 : Piktogram pro označení SO_2 na etiketě (zdroj: NKEU 579/2012)

2.7 Formy použití SO₂

Ve vinařství se oxid siřičitý používá hned v několika formách, které mají různé vlastnosti, skupenství i využití. Základní dělení forem SO₂ můžeme oddělit podle skupenství: Pevná, kapalná a plynná. Oxid siřičitý je, i přes mnoho svých forem, vyjadřován jako SO₂ v mg.l⁻¹.

2.7.1 Spalování pevné síry

Nejjednodušší způsob jak získat oxid siřičitý je spalováním síry. Jde o nejstarší způsob používání síry v enologii. Hořící síra je uvnitř nádoby a za vzniku oxidu siřičitého postupně vytěsňuje vzduch z nádoby ven. Víno se následně stáčí do zasiřené nádoby, kdy nedochází k oxidaci vlivem vzduchu, ale i k nasycení vína plynem. Tento způsob se používá při úpravě volného oxidu siřičitého, ale především k sterilizaci a konzervaci prázdných nádob. Síření tímto způsobem se využívá jen zřídka, protože je to metoda značně nepřesná, navíc opakovaným spalováním síry dochází k acidifikaci vína. Tento postup je z pravidla typický u dřevěných sudů a plastových nádob. Spalování síry v nerezavějících nádobách se nedoporučuje, protože plyn je silně agresivní vůči těmto materiálům. (Steindl, 2010)

2.7.2 Plynný oxid siřičitý

Plynný oxid siřičitý se uchovává v kovových lahvích, kde se při běžné teplotě za velkého tlaku 3 barů zkapalní. Touto formou se aplikují vysoké dávky, které se stanovují vážením přímo tlakové lahve nebo dávkovačem, kdy je umožněno uvolňovat plyn z lahve přímo do nádoby. Pro velkoobjemové nádoby se používají i ampule s kovovou kapslí, která se uvnitř nádoby proděraví. (Steindl, 2010)

2.7.3 Disiřičitan draselný

Je to bílý krystalický prášek se štiplavým sirným zápachem, jehož vzorec je $K_2S_2O_5$ známý též pod názvem pyrosulfid. Obecně platí, že z 1 g pyrosulfitu se uvolní 0,5 g SO_2 . Jeho aktivita se projevuje až v kyselém prostředí. Po aplikaci do vína dojde k reakci s kyselinou vinnou, při níž vznikne SO_2 a hydrogenvinan draselný. (Steindl, 2010)

2.7.4 Síření pomocí vodných roztoků

Jedná se o roztoky kyselého siřičitanu draselného ($KHSO_3$), či siřičitanu amonného ($(NH_4)_2SO_3$). Tyto roztoky se vyrábějí v koncentracích 10, 18, 20 a 40 %. Jsou koncentrovanější a méně snadno se smíchávají. Jsou méně acidifikační než ostatní formy, protože jejich acidita je částečně neutralizována. (Michlovský, 2012) Navíc při síření siřičitanem amonným dodáváme do daného materiálu i amoniakální dusík, který dále využijí kvasinky. Proto se nedoporučuje zastavovat alkoholovou fermentaci touto formou oxidu siřitého.

3. Cíl práce

Tato práce se zabývá vlivem síření vína na vznik sloučenin, které se váží na oxid siřičitý. Primárně se jedná, o karbonylové sloučeniny především acetaldehyd a ketokyseliny: pyruát a 2-oxoglutarát. V rámci práce byly vyrobeny experimentální vína, která byla různě sířena. Počáteční koncentrace se lišily jak v mošttech, tak ve vínech. Následně byly každých 14 dní odebírány vzorky a měřen volný SO₂. Vzorky se následně podrobily analýze kapalinovou chromatografií a vyhodnotily. Cílem je tedy zjistit jaký má vliv management SO₂ na vznik karbonylových sloučenin ve víně. A jak ovlivňuje síření vín hodnoty karbonylových sloučenin.

4. Experimentální část

4.1 Materiál

4.1.1 Výběr odrůdy

Tento pokus byl proveden na odrůdě „Ryzlink rýnský“. Odrůda byla vybrána, díky pozdnímu dozrávání a nízkému profilu aromatických prekurzorů a primárních vonných látek v hroznech. Z experimentálních vín byla vyrobena bílá vína. Celá technologie výroby experimentálních vín proběhla v Lednici na Moravě ve školním sklepě na ústavu vinohradnictví a vinařství. Jednotlivé šarže vína byly vyrobeny stejným technologickým postupem, ve stejných objemech, lišily se jen počáteční koncentrace oxidu siřičitého. Samotné hrozny pochází ze školní vinice z areálu zahradnické fakulty v Lednici na Moravě.

4.1.2 Charakteristika vybrané odrůdy ‘Ryzlink rýnský’

Tato odrůda má zřejmě kořeny v Německu, písemné zmínky jsou již od roku 1435. Odrůda tehdy nebyla příliš oblíbená, a tak se zpracovávala do směsí s jinými odrůdami. V 18. Století se náhodně podařilo mnichům benediktinského řádu v Porýní sklídit úrodu, která byla napadena ušlechtilou plísní. Z tohoto přezrálého materiálu bylo vyrobeno víno nejlepší kvality. Křížení odrůdy je pravděpodobně ‘Heunisch’ a ‘Tramín’ (Kraus, 2005). Do státní odrůdové knihy byla zapsána v roce 1941.

‘Ryzlink rýnský’ je pozdní moštová odrůda, která má bujný růst, se vzpřímenými, někdy polovzpřímenými letorosty. Sklizňová zralost začíná v polovině Října. Odolnost vůči houbovým chorobám je nízká až střední. Nároky na stanoviště jsou málo náročné, vhodné jsou lehčí a snadno záhřevné půdy. Odrůda je považována za nejkvalitnější pro severní vinohradnické oblasti (Richter, Ludvíková, 2004).

V chuti ryzlinkových vín hraje velkou roli kyselina a její zralost. Nejtypičtěji se ‘Ryzlink rýnský’ projevuje ve zralých suchých, kabinetních vínech. Ve vyšších

stupních přívlastkových vín se ve vínech s narůstajícím tělem objevují případné tóny zralosti pocházející z napadení ušlechtilou plísní. Taková vína jsou neméně zajímavá a konzumentovi přináší jiný druh požitku.

Barva vín této odrůdy může být: zelenožlutá, zlatavá až jantarová, závisí na stáří vína a vyzrállosti hroznů.

Aroma vína hraje širokou škálou vůní od ovocných plodů, přes kořenité, minerální až zemité tóny. U starých vín můžeme detekovat typický petrolejový tón.

Chuť vína je také velmi rozmanitá, záleží na ročníku a lokalitě pěstování. Chuť vína je tedy od ocelové kyseliny z nezralých ročníků, přes příjemně říznou až po svěže zralou, která je nezbytnou součástí velkých vín skvělých ročníků a současně oporou tvorby buketu a chuťových látek lahvové zralosti. (Kraus, 2005)

4.1.3 Technologie experimentálních vín

Výroba experimentálních vín probíhala ve sklepě na ústavu vinohradnictví a vinařství v Lednici na Moravě. Hrozny, které byly použity na výrobu vín, pocházely ze školních vinic.

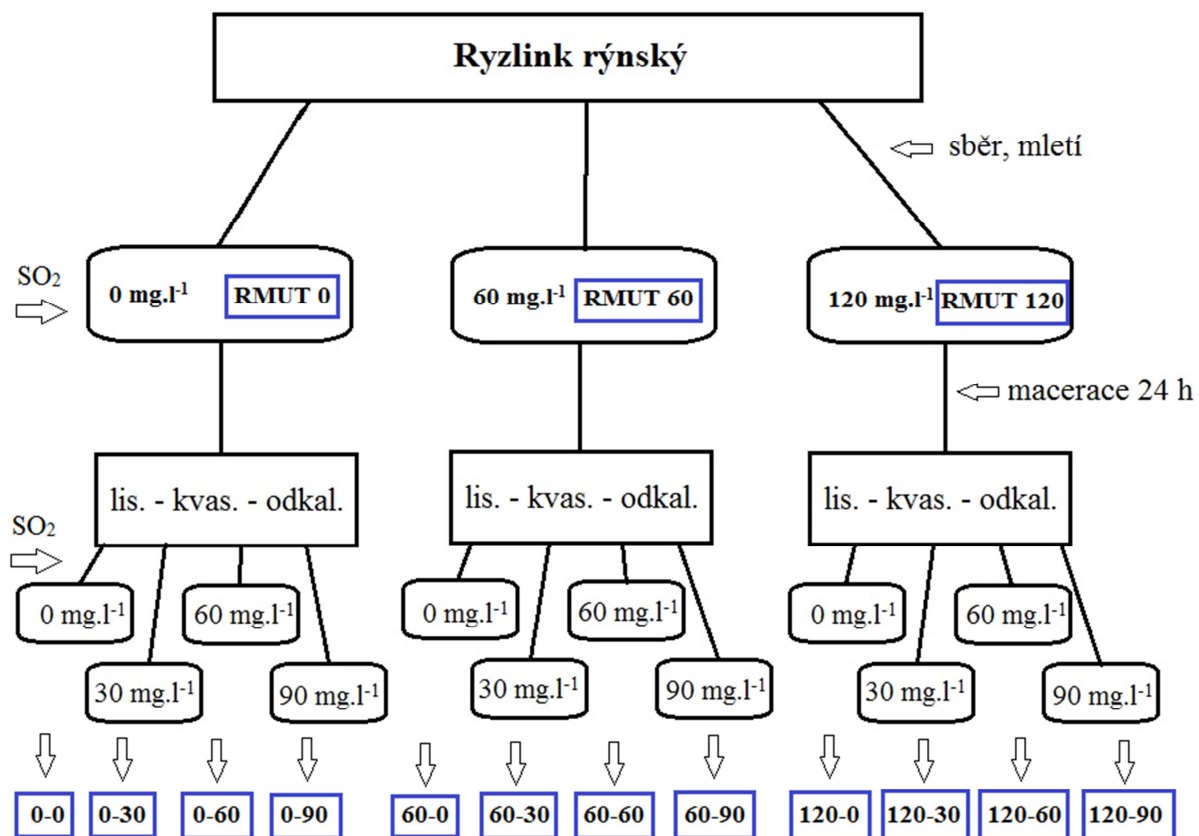
Výroba byla započata 7.10. 2015 ručním sběrem hroznů, svozem beden ke školnímu sklepu, kde se hrozny pomlely na mlýnkoodzrňovači. Rmut byl rozdělen do tří 60 l nádob a zasířen první dávkou oxidu siřičitého. První šarže nebyla sířena vůbec (RMUT 0), do druhé šarže byla přidána dávka 60 mg.l⁻¹ (RMUT 60) rmutu volného SO₂ a do třetí bylo přidáno 120 mg.l⁻¹ (RMUT 120) volného SO₂. Pro zasíření byla zvolena tekutá forma oxidu siřičitého, čili hydrogensířičitan amonný. Rmut se nechal naležet 24 h. Po naležení hroznů se jednotlivé šarže vylisovaly.

Cukernatost moštu byla 21,2°NM, hodnota pH byla 3,15 a obsah asimilovatelného dusíku byl 168 YAN. Mošt nebyl nijak upraven a nebyly přidány žádné aditiva. Mošt byl přečerpán do demižonů, kde proběhlo hrubé odkalení. Již v této fázi se projeví rozdíl v obsahu volného oxidu siřičitého, kdy mošt nesířené šarže byl zcela hnědý a naopak šarže s největší koncentrací SO₂ byla zdravě zeleně zabarvená. Odkalení moštu probíhalo 24 h, poté se mošt stočil z hrubých kalů. Po odkalení, proběhla inokulace moštu komerčními odrůdovými kvasinkami pro 'Ryzlink rýnský' od firmy Laffort. Následně proběhla alkoholová fermentace.

Varianta pokusu bez přídavku oxidu siřičitého se rozkvasila nejdříve, následně pak varianta s 60 mg.l⁻¹ a naposled se rozkvasila varianta zasířená nejvíce a to 120 mg.l⁻¹ SO₂. Po dokončení fermentace byly jednotlivé šarže vína stočeny z hrubých kvasničných kalů. Každá šarže se ještě rozdělila na další 4 šarže, čili vzniklo 12 variant o objemu 3 l. (Obr. 5) Nádoby byly zvoleny skleněné demižony se silikonovým uzávěrem. Ty se pak zasířily různými koncentracemi, a to: 0, 30, 60, 90 mg.l⁻¹ volného oxidu siřičitého. Víno nebylo nijak čiřeno, ani nebyly použity žádné enologické preparáty pro krášlení samotných vín. Následně byly z jednotlivých šarží odebírány vzorky vín, které se hned zamrazily (-15°C). Také byly měřeny hodnoty volného oxidu siřičitého. Po této laboratorní aktivitě byly šarže dosířeny na původní hodnoty. Odběr vzorků a měření volného SO₂ probíhalo v časovém intervalu 14 dní.

4.1.4 Schéma experimentu

Pro lepší přehlednost experimente, bylo vytvořeno schéma. V modrých políčkách jsou použity zkratky, které budou dále používány v textu.



Obr. 5 : Schéma experimentu

4.2 Metody měření

Všechna analytická měření byla provedena v laboratoři na ústavu vinohradnictví a vinařství v Lednici na Moravě. V moštu byly stanoveny obsahy titrovatelných kyselin a asimilovatelného dusíku, dále cukernatost a pH. V moštu byl změřen také volný a vázaný SO₂. Cukernatost moštu byla stanovena pomocí moštoměru v (°NM), hodnota pH moštu byla stanovena pH metrem.

4.2.1 Měření pomocí přístroje ALPHA

Přístroj ALPHA je kompaktní FTIR analyzátor využívající vzorkovací techniku ATR, která významně zjednodušuje úpravu vzorku před analýzou. Vzorky čirých vín byly tedy analyzovány bez úpravy, zatímco u moštů a kvasících vín byla provedena centrifugace při 13,4 tis. ot./min po dobu 6 minut. Před zahájením měření prvního vzorku byl přístroj důkladně propláchnut deionizovanou vodou a bylo změřeno pozadí (slepý vzorek = deionizovaná voda). Pro analýzu byl pomocí stříkačky odebrán 1 ml čirého vzorku, přičemž 0,5 ml posloužilo k proplachu systému a z druhého 0,5 ml vzorku byla provedena tři měření. V závislosti na použité kalibraci (mošty / kvasící vína / hotová vína) byla změřená data pomocí softwaru automaticky vyhodnocena a převedena do tabulky. (Kobližka, 2013)

4.2.2 Stanovení oxidu siřičitého titrací odměrným roztokem jódu

Princip: Odměrným roztokem jódu oxiduje přímo volný oxid siřičitý obsažený ve víně, případně po uvolnění oxidu siřičitého z vazeb s karbonylovými sloučeninami v alkalickém prostředí současně i vázaný oxid siřičitý vína.

Přístroje a pomůcky: 250 ml kónická baňka, 50 ml pipeta, 10 ml a 25 ml odměrná baňka, 25 ml byreta

Chemikálie a roztoky: 0,002 mol.l-1 roztok jódu, 1 mol.l-1 roztok NaOH, 0,5% škrobový maz, 16% roztok H₂SO₄

Postup: a) volný oxid siřičitý: Do kónické baňky nepipetujeme 50 ml testovaného vína, poté přidáme 10 ml 16% H₂SO₄ a asi 5 ml 0,5% škrobového mazu a ihned titrujeme jódem do modrého zbarvení, které vydrží minimálně 30 sekund.

b) veškerý oxid siřičitý: Do kónické baňky odměříme 25 ml 1 mol.l-1 roztoku NaOH a odpipetujeme 50 ml testovaného vína. Po 15 minutách stání přidáme 15 ml 16% H₂SO₄ a asi 5 ml 5% škrobového mazu, ihned titrujeme jódem do modrého zbarvení, které vydrží minimálně 30 sekund.

Vyhodnocení:

$$x = a * f * 12,8$$

x = volný, veškerý oxid siřičitý

a = spotřeba jódu

f = faktor 0,002 mol.l-1 roztoku jódu, (Balík, 2006).

4.2.3 Stanovení kyseliny askorbové a reduktonů

Princip: Ve víně se vyskytují vedle oxidu siřičitého i jiné sloučeniny s redukčními schopnostmi, které mohou být oxidovány roztokem jódu. Jedná se zejména o tzv. reduktony, případně kyselinu askorbovou, jejíž omezený přídavek do vín je povolen.

Přístroje a pomůcky: 250 ml kónická baňka se zábrusem a zátkou, 50 ml byreta, 50 ml pipeta.

Chemikálie a roztoky: 1 % roztok acetaldehydu, 0,02 mol . l⁻¹ roztok jódu, 16 % roztok H₂SO₄, 0,5 % škrobový maz.

Postup: Do 250 ml kónické baňky se zábrusem odměříme pomocí pipety 50 ml testovaného vína. Přidáme 5 ml 1 % roztoku acetaldehydu, obsah krátce promícháme a

uzavřeme zátkou. Po 30 minutách přidáme 10 ml 16 % roztoku H_2SO_4 , přidáme asi 5 ml škrobového mazu a titrujeme $0,02 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztokem jódu do modrofialové barvy, která vydrží 15 sekund.

Vyhodnocení:

$$x = a \cdot f \cdot 35,2$$

x = koncentrace kyseliny askorbové a reduktonů vyjádřená jako kyselina askorbová v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$

a = spotřeba $0,02 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku jódu v ml

f = faktor $0,02 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku jódu (Kobližka, 2013)

4.2.4 Stanovení veškerých titrovatelných kyselin (EEC No 2676/90)

Princip: Veškerými titrovatelnými kyselinami (aciditou) se rozumí suma sloučenin titrovatelných odměrným alkalickým roztokem do pH 7. Kyselina uhličitá se do veškeré kyselosti nezahrnuje.

Přístroje a pomůcky: 25 ml byreta, 10 ml pipeta, 50 ml kádinka, pH-metr, magnetická míchačka, odsávací baňka, vodní vývěva.

Chemikálie a roztoky: $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztok NaOH

Postup: Oxid uhličitý odstraníme za stálého třepání asi z 50 ml testovaného vína v odsávací baňce zapojené na vodní vývěvu. pH-metr kalibrujeme při 20°C podle návodu k přístroji (automatický titrátor TitroLine Easy) standardní tlumivý roztok o pH 7. Pipetou odměříme 10 ml připraveného vína do titrační kádinky, přidáme 10 ml destilované vody a do směsi ponoříme kombinovanou elektrodu pro měření pH. Za stálého míchání pomalu titrujeme $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztok NaOH do pH rovnající se hodnotě 7 při 20°C .

Vyhodnocení:

$$X = a \cdot f \cdot 0,75$$

X = $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ veškerých titrovatelných kyselin vyjádřené na jedno desetinné místo jako kyselina vinná

a = ml spotřebovaného 0,1 mol.l⁻¹ roztoku NaOH

f = faktor 0,1 ml.l⁻¹ roztoku NaOH (Balík, 2011)

4.2.5 Stanovení celkového asimilovatelného dusíku

Hodnota asimilovatelného dusíku byla zjištěna také pomocí automatického titrátoru TitroLine Easy. Po změření obsahu veškerých titrovatelných kyselin, bylo do měřeného vzorku dodáno 5 ml formaldehydu – upraveného na pH 8,1 díky roztoku NaOH. Po přidání formaldehydu nastal pokles hodnoty pH v měřeném vzorku. Poté pokračovala titrace 0,1 mol.l⁻¹ roztokem NaOH za stálého promíchávání magnetickou míchačkou. Ta byla ukončena ve chvíli, kdy zkoumaný vzorek dosáhl hodnoty pH 8. Tato hodnota musí opět vydržet i po důkladném promíchání.

$$X = a \cdot 0,14 \cdot 100 \cdot f \text{ [mg N} \cdot \text{l}^{-1}\text{]}$$

X - množství dusíku v [mg N.l⁻¹]

a - spotřeba roztoku NaOH v ml.l⁻¹

f - faktor roztoku NaOH (Balík, 2011)

4.2.6 HPLC analýza karbonylových sloučenin ve víně

Metoda HPLC (High-performance liquid chromatography – vysoko účinná kapalinová chromatografie) je chemicko-fyzikální metoda, která slouží k separaci složek daného vzorku a na jejich identifikaci a kvantifikaci. Její podstatou je rozdělování složek směsi mezi dvěma fázemi, nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní). Pohyblivá fáze vstupuje do vysoko tlakového čerpadla, do kolony menších rozměrů. V ní se nachází sorbent, tvořený velmi malými částicemi, nejčastěji ze silikátu nebo polymeru. Na tyto částice se váže stacionární fáze. Princip separace spočívá v rozdílné schopnosti zadržování látek v chromatografické koloně na sorbentě. Interakce mezi sorbentem a složkami vzorku jsou fyzikální povahy, např. hydrofobní, nebo na základě polarit. HPLC se od ostatních chromatografických

metod odlišuje vyšším tlakem (50 až 350 barů), zatím co při běžných kapalinových chromatografiích mobilní fáze přepadá přes kolonu jen díky gravitaci. Díky malému množství vzorku oddělené v HPLC má také rozlišovací schopnost (MOLIKI a kol. 2014)

Použijeme metodu HPLC pro detekování karbonylových sloučenin: acetaldehydu, glycerinaldehydu, kyseliny pyrohroznové, kyseliny 2-oxoglutarové a formaldehydu ve víně pomocí kapalinové chromatografie s detekcí diodového pólu. Tyto sloučeniny jsou jak ve formě volné tak vázané na SO_2 , a proto použijeme techniku založenou na rozkladu těchto vazeb hydrolyzou v alkalickém prostředí pomocí přidání 2,4-dinitrofenylhydrazónu. Při měření je důležité zamezení vlivu kyslíku, který zvyšuje koncentraci karbonylových sloučenin. Tato technika nabízí dobrou specifikaci a opakovatelnost (% RSD 0,45-10,6) a rozpoznatelnost ($1,29-7,53 \mu\text{g.l}^{-1}$). (Elias a kol., 2008)

Postup: do 100 μl testovaného vína přidáme 100 μl 1 mol.l^{-1} NaOH a nechá se 10 minut stát při pokojové teplotě. Potom přidáme 100 μl 1,2 mol.l^{-1} H_2SO_4 a 200 mikrol 12 mmol.l^{-1} 2,4-dinitrofenylhydrazonu v acetonitrilu. Nechá se 10 minut odstát při teplotě 60 °C a potom 20 μl roztoku aplikujeme do HPLC na samotné měření.

Přístroj: Binární vysokotlakový systém Shitadzu LC-10A

Kontrolní systém: SCL-10Avp

Pumpa: 2 x LC-10ADvp

Kolonový termostat s manuálním vstřikovacím ventilem Rheodyne: CTO-10ACvp

DAD detektor: SPD-M10Avp

Software: Lcsolution

Podmínky separace:

Kolona: Macherey-Nagel Nucleoshell RP18 2,7 μm ; 3 x 100 mm sestava + před kolona 3 x 7,5 mm

Teplota: 60 °C

Objem aplikovaného vzorku: 20 μl

Průtok mobilní fáze: 0,6 ml.min^{-1}

Mobilná fáze A: 15 mM HClO_4

Mobilná fáze B: 15 mM 90 % ACN

5. Výsledky práce

Experimentální vína byla podrobena senzorické analýze a také analytickému rozboru se zaměřením na karbonylové sloučeniny. Dále byla po dobu pokusu sledována koncentrace volného SO₂, v závěru pokusu byl změřen veškerý oxid siřičitý.

Dne 16.3.2016 proběhla na ústavu vinohradnictví a vinařství senzorická analýza experimentálních vín. Celkově hodnotilo 11 degustátorů. Mezi hodnotiteli byly vyučující a studenti vinohradnictví a vinařství. Pro degustaci byly použity skleničky typu OIV o objemu 210 ml. Vína se hodnotila stobodovým systémem a dále dotazníkem v podobě tabulky, kde se degustátoři zaměřili především na aromatické vjemy, odrůdovost a barvu vín.

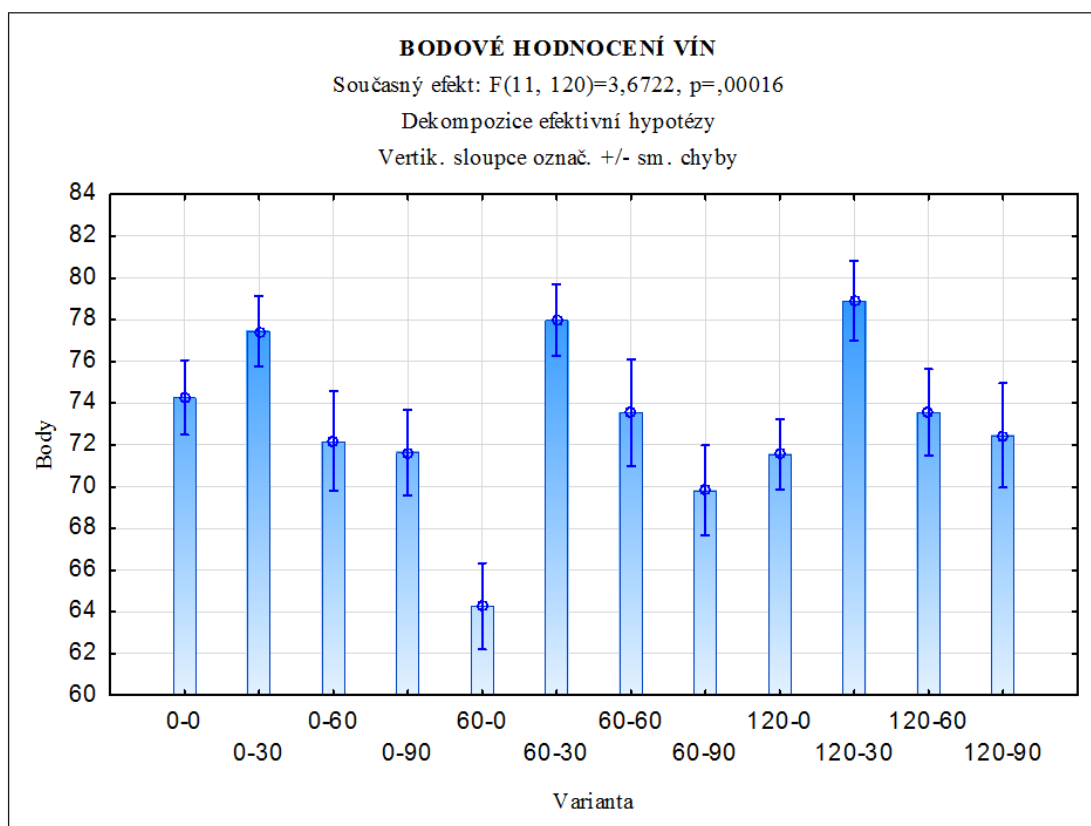
Tabulka 2 – *Hodnotící tabulka senzorické analýzy*

1 až 10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Intenzita barvy												
Intenzita SO ₂												
Odrůdový charakter												
Mléčné tóny												
Negativní sirné tóny												
Míra oxidace												

5.1 Výsledky senzorické analýzy

Výsledky senzorické analýzy z hodnocení stobodovou stupnicí byly statisticky vyhodnoceny a zpracovány do grafů.

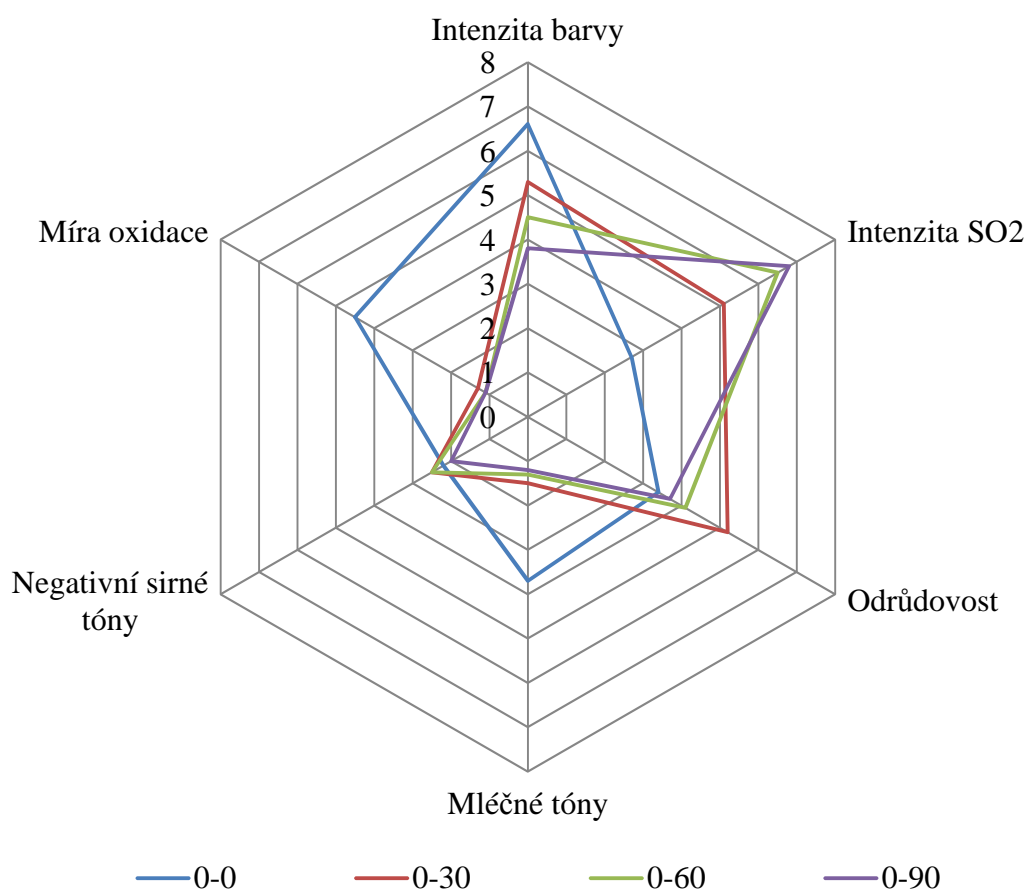
5.1.1 Bodové hodnocení experimentálních vín



Graf 2: Bodové hodnocení vín

Z grafu je patrné, že nejméně bodů získaly vína, která nebyla po dokončení alkoholové fermentace zasířená a naopak vína, která byla po celou dobu pokusu sířena nejvíce, čili koncentrace oxidu siřičitého během sensorické analýzy překračovala 60 mg.l^{-1} . Naopak vína s nejvyšším počtem bodů byla vína s koncentrací oxidu siřičitého 30 mg.l^{-1} . Nejlépe si vedla varianta 120-30, nejhůře ohodnocené víno byla varianta 60-0.

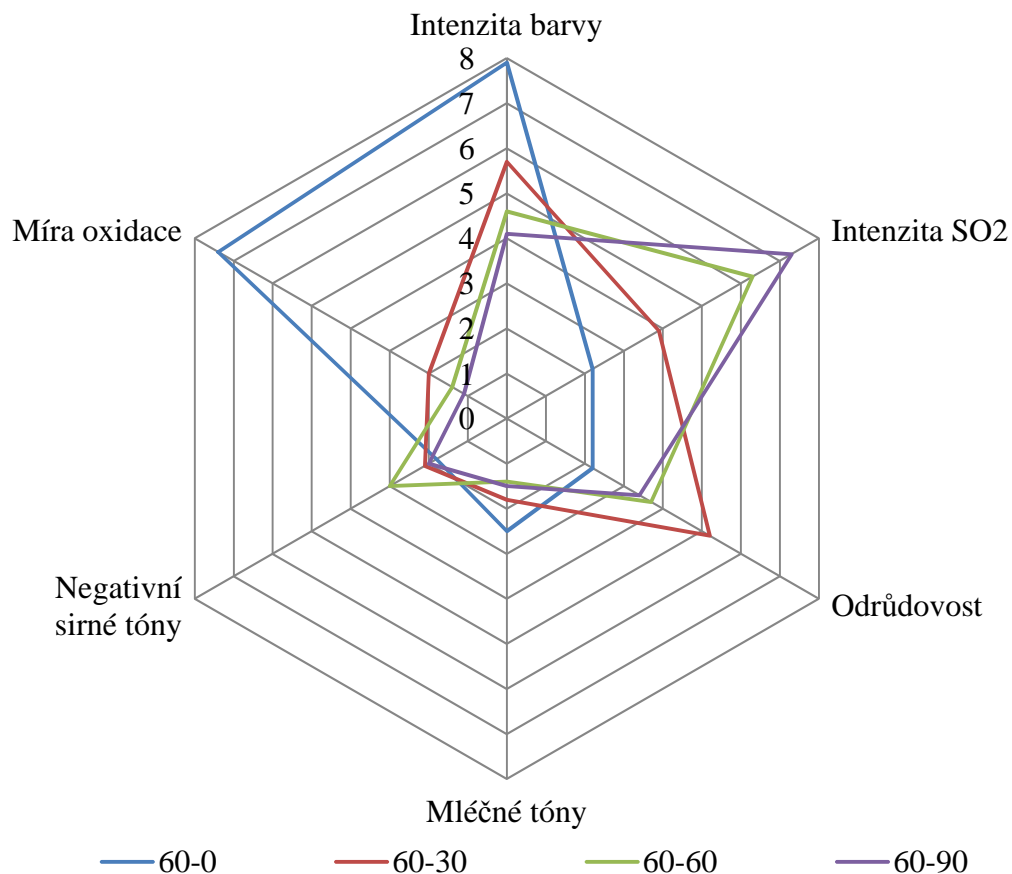
5.1.2 Senzorika analýza experimentálních vín



Graf 3: Graf vyhodnocení senzorické analýzy vín 1

Z tohoto grafu lze vyčíst, že nejvýznamnější rozdíly byly u varianty 0-0, kdy tato nesířená varianta měla nejvyšší intenzitu barvy, mléčných tónů a míru oxidace. Naopak nejnižší hodnota byla zaznamenána u intenzity SO₂. Mezi ostatními variantami nebyly výrazné statistické rozdíly, kromě varianty 0-30 kde hodnotitelé zaznamenali nižší intenzitu SO₂ a největší odrůdovost ze všech vzorků. Co se týče intenzity barvy vín, výsledky korespondují s hodnotami SO₂ v jednotlivých vínech, čili s rostoucí koncentrací oxidu siřičitého ve vínech, klesá intenzita barvy vín.

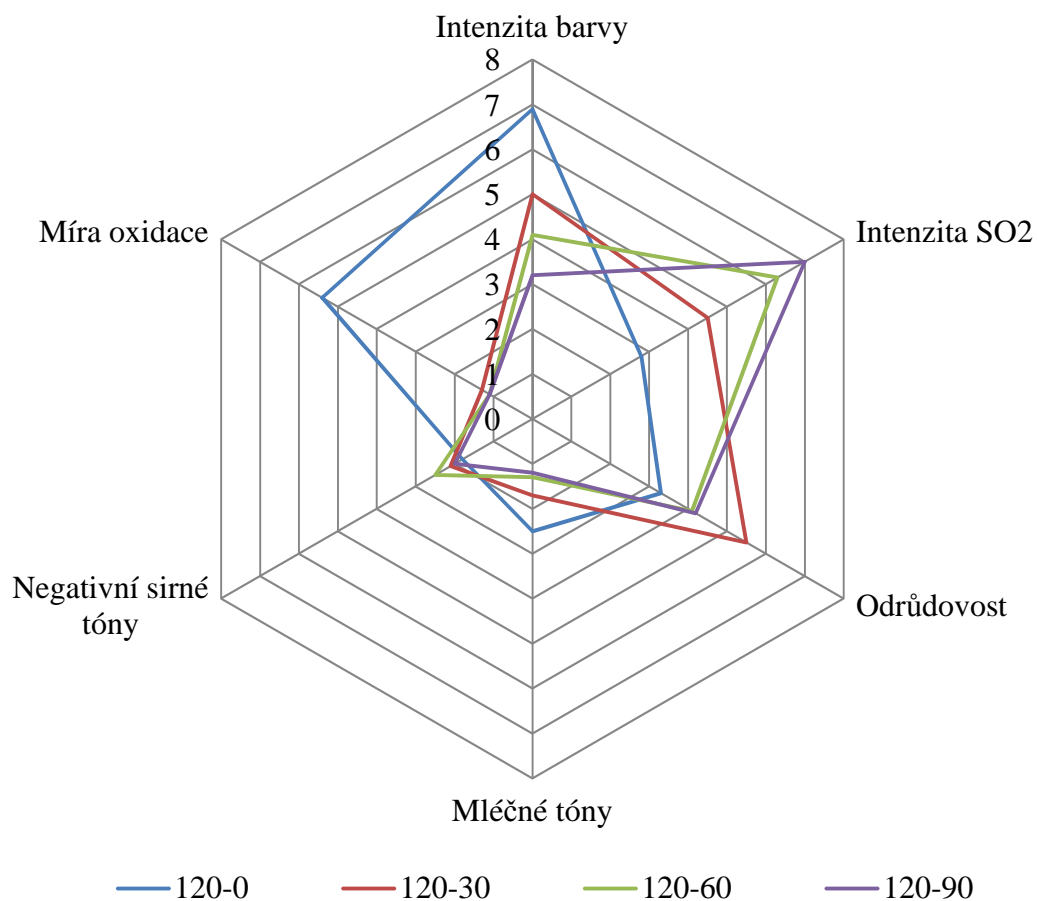
5.1.3 Senzorika analýza experimentálních vín



Graf 4 : Graf vyhodnocení sensorické analýzy vín 2

Na tomto grafu vidíme, že mezi jednotlivými variantami, byly průkazné sensorické rozdíly. U varianty 60-0 byla detekována největší míra oxidace, intenzita barvy a intenzita mléčných tónů. Naopak odrůdovost a intenzita SO₂ byla nejnižší. Varianta 60-60 vynikala nejvyšší hodnotou negativních sirných tónů. U ostatních variant spolu korelovaly: intenzita barvy, intenzita SO₂ a odrůdovost tzn., méně sířená vína měla větší odrůdový charakter a intenzivnější barvu a nejvíce sířená vína měla intenzitu barvy a odrůdovost nejnižší.

5.1.4 Senzorika analýza experimentálních vín



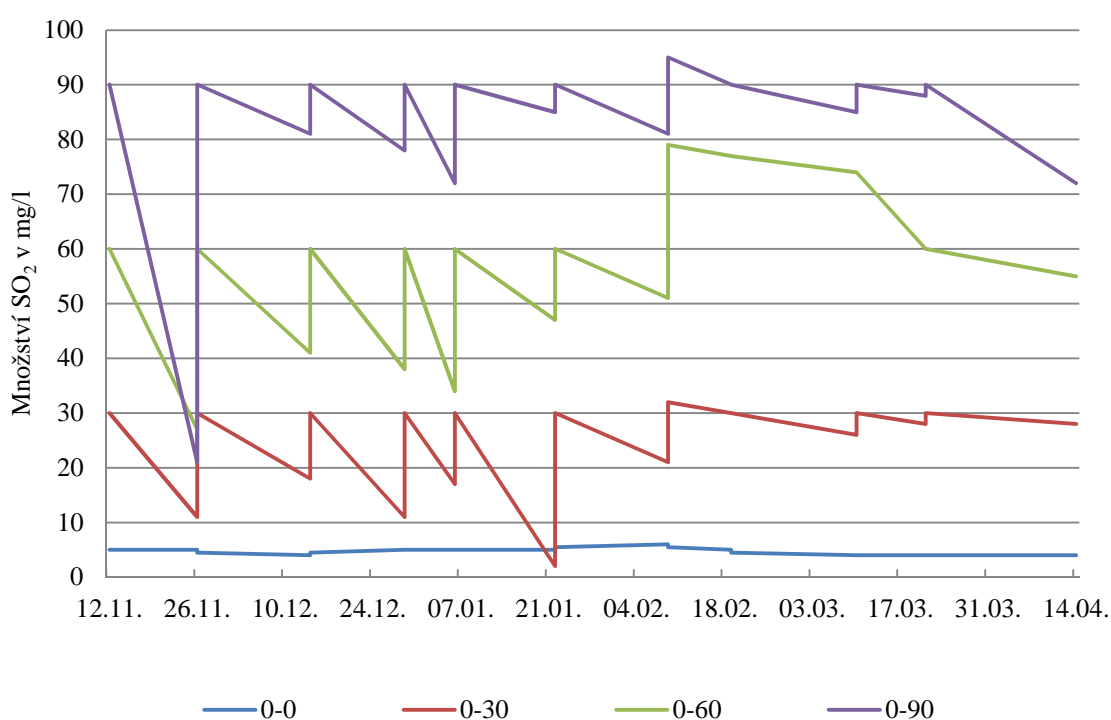
Graf 5: Graf vyhodnocení senzorické analýzy vín 3

Z grafu senzorické analýzy vín 3 můžeme vyčíst, že varianta 120-0 vykazovala nejvyšší intenzitu barvy, míru oxidace a intenzitu mléčných tónů. Ostatní varianty mají podobnou závislost na intenzitě SO₂, barvě vín a odrůdovém charakteru.

5.2 Měření volného SO₂

Měření koncentrace volného oxidu siřičitého probíhalo v laboratoři na ústavu vinohradnictví a vinařství v Lednici. Volný oxid siřičitý se stanovoval jodometricky titračním roztokem jódu, vždy po dvou opakování. Naměřené hodnoty se zprůměrovaly. Hodnoty byly zpracovány do grafů a do tabulky.

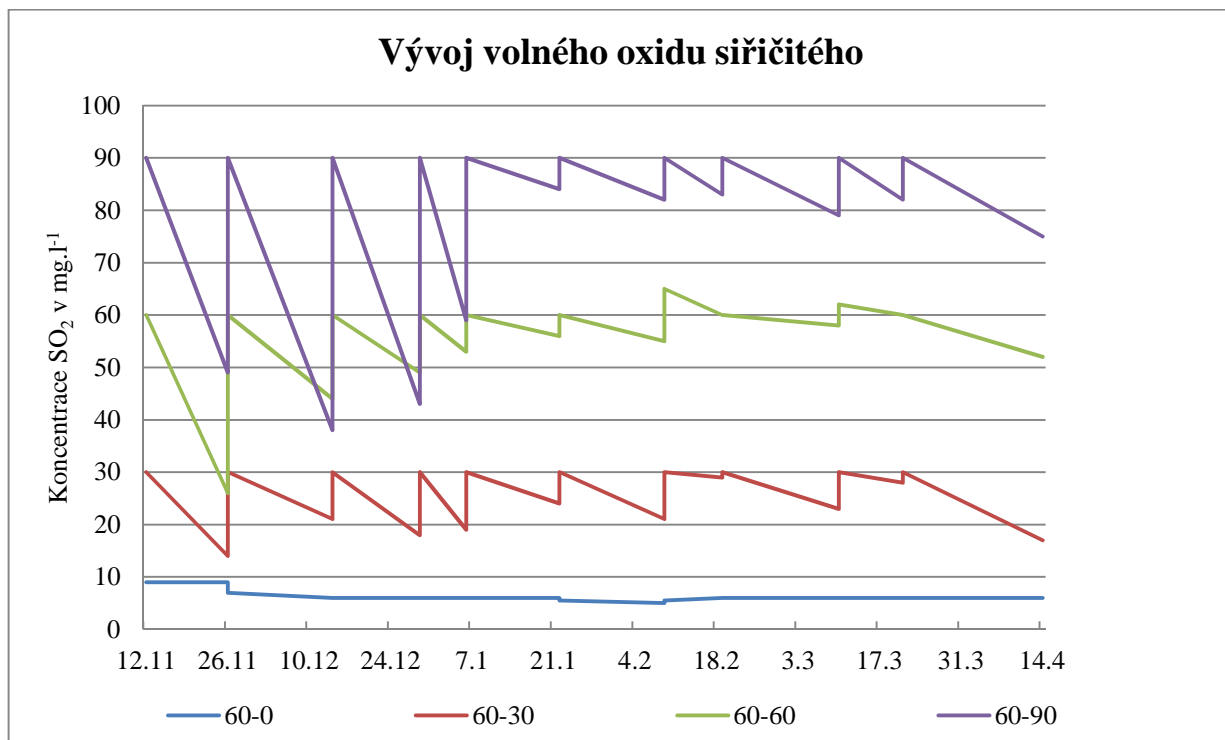
5.2.1 Vývoj volného oxidu siřičitého ve vínech



Graf 6: Vývoj volného oxidu siřičitého ve vínech

Na tomto grafu je zaznamenán vývoj volného oxidu siřičitého v experimentálních vínech. Je patrné, že po prvním zasíření vín je pokles volného SO₂ dynamický. V první polovině pokusu byl pokles volného SO₂ stále významný, u všech variant. Ve druhé dekádě docházelo k ustálení koncentrace volného SO₂ a jeho menším poklesům. Nejvýznamnější poklesy volného SO₂ byly u varianty 0-60, dále u varianty 0-30 a nejmenší rozdílly byly u varianty 0-90.

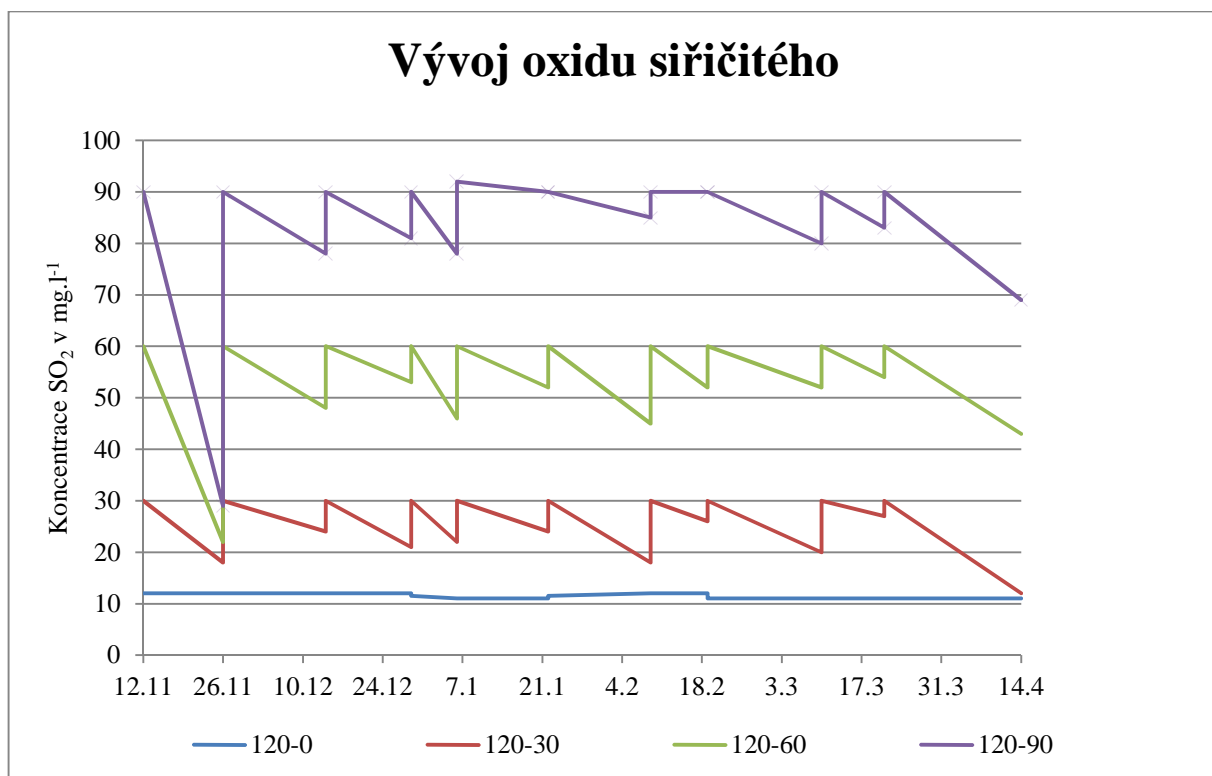
5.2.2 Vývoj volného oxidu siřičitého ve vínech



Graf 7: Vývoj volného oxidu siřičitého ve vínech

Z grafu vývoje volného oxidu siřičitého ve vínech je patrné, že největší poklesy koncentrace volného SO_2 , byly naměřeny v první polovině pokusu, přesně první 4 měření. Následné rozdíly mezi naměřenými hodnotami a dosířenými nebyly až tak velké. Nejvyšší poklesy volného SO_2 byly naměřeny u varianty 60-90, kdy první tři měření tvořil pokles až 50 % původní hodnoty volného SO_2 . Varianty 60-30 a 60-60 jsou si svým vývojem volného SO_2 velmi podobné až na to, že u varianty 60-60 byl propad obsahu volného SO_2 daleko větší.

5.2.3 Vývoj volného oxidu siřičitého ve vínech



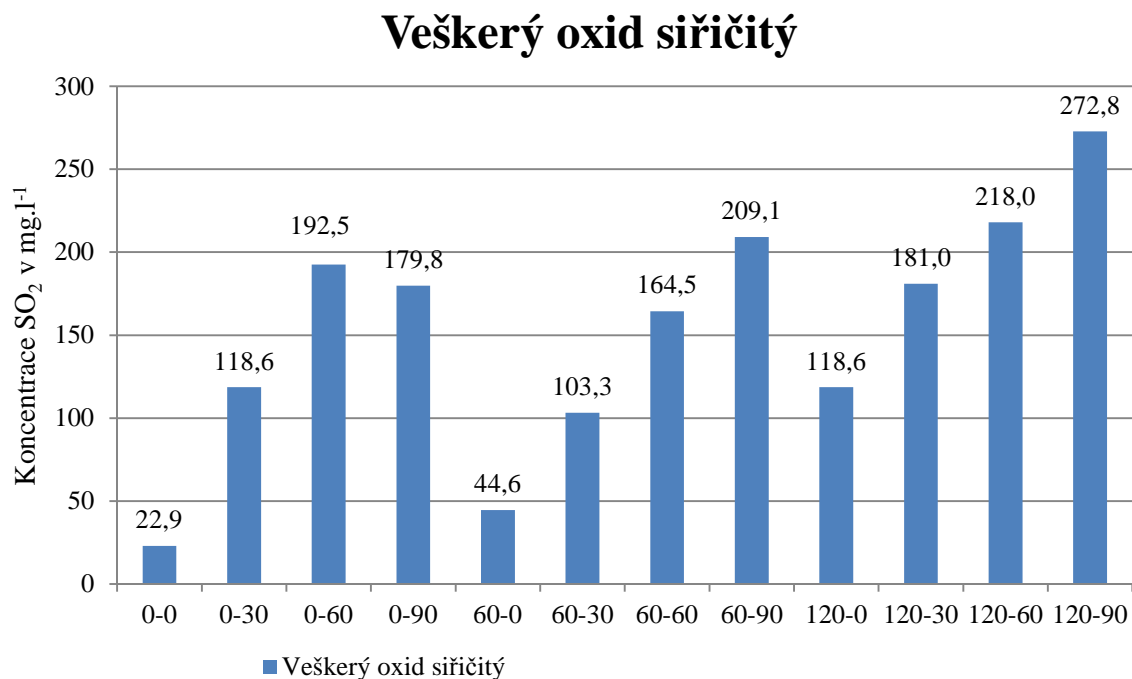
Graf 8: Vývoj volného oxidu siřičitého ve vínech

Na tomto grafu vidíme vývoj koncentrace volného oxidu siřičitého v experimentálních vínech. Největší pokles byl zaznamenán při prvním síření vín, kdy se hluboce propadly koncentrace volného SO₂ u variant 120-90 a 120-60. Ostatní varianty, s výjimkou 120-0, měly velmi podobný charakter poklesu volného SO₂ během celého pokusu.

Tabulka 3 – Hodnoty volného oxidu siřičitého

Datum	Hodnoty volného oxidu siřičitého v mg.l ⁻¹											
	0-0	0-30	0-60	0-90	60-0	60-30	60-60	60-90	120-0	120-30	120-60	120-90
26. 11. 2015	5,6	11,3	27,8	21,4	9,4	14,7	26,5	49,4	12,4	18,6	22,3	29,5
14. 12. 2015	0,8	18,4	41,4	81,6	6,3	21,6	44,3	38,2	12,4	24,4	48,7	78,3
29. 12. 2015	0,2	11,7	38,7	78,7	6,7	18,2	49,4	43,3	12,7	21,9	53,8	81,4
6. 1. 2016	5,8	17,5	34,6	72,3	6,1	19,3	53,3	59,1	11,9	22,3	46,3	78,3
22. 1. 2016	5,7	2,3	47,2	85,4	6,4	24,4	56,4	84,7	11,7	24,4	52,4	92,3
9. 2. 2016	6,5	21,1	51,3	81,2	5,8	21,8	55,2	82,3	12,2	18,3	45,6	85,7
19. 2. 2016	5,4	32,8	79,4	95,7	6,2	29,6	65,3	83,5	12,1	26,7	52,3	90,8
10. 3. 2016	4,8	26,8	82,3	85,6	6,3	23,3	58,1	79,1	5,6	20,3	52,4	80,8
21. 3. 2016	4,1	28,4	77,8	88,3	6,4	28,4	61,5	82,2	5,4	27,7	54,2	83,5
14. 4. 2016	4,7	34,7	79,7	72	6,5	17,2	52,3	75,3	5,7	12,8	43,1	69,3

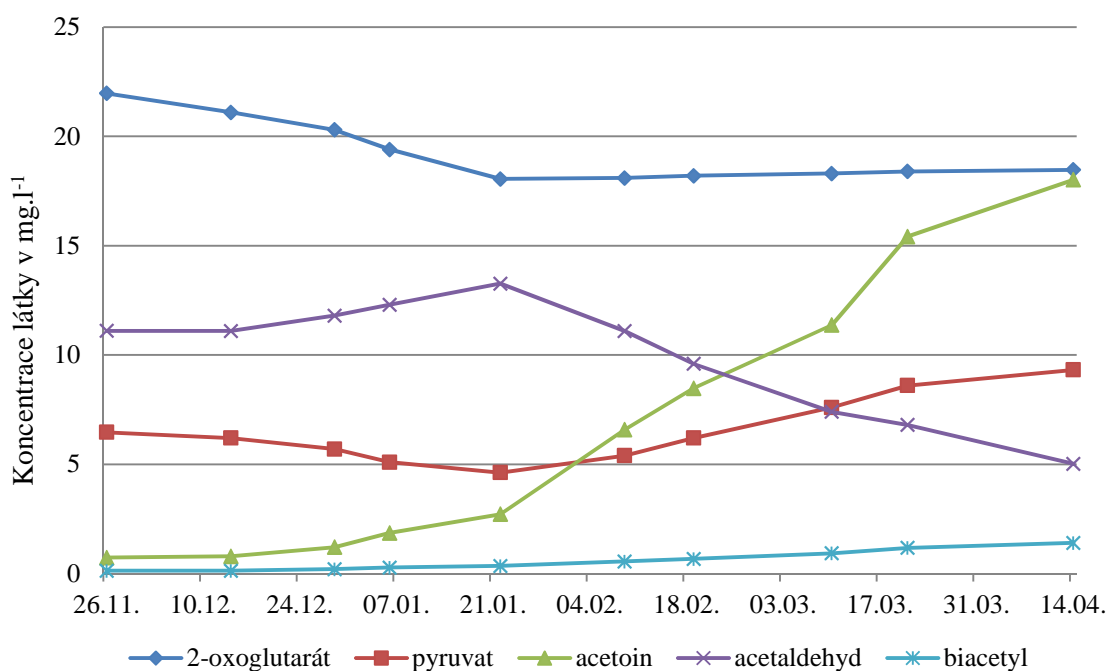
5.2.4 Hodnoty veškerého oxidu siřičitého ve vínech



Graf 9: Hodnoty veškerého oxidu siřičitého ve vínech

Tento graf popisuje koncentrace veškerého oxidu siřičitého ve vínech. Jde zde vidět, že varianty, které nebyly sířeny po alkoholové fermentaci, mají nejnižší hodnoty veškerého SO₂ a korespondují tak s původními koncentracemi volného SO₂ v moštu. U varianty 0-0, která nebyla sířená vůbec, bylo i přes to naměřeno 22,9 mg.l⁻¹. Jedná se tedy o oxid siřičitý, který si kvasinky vytvořily během alkoholové fermentace. Ostatní varianty obsahují hodnoty veškerého SO₂ dle předpokladu a dle počátečních koncentrací SO₂.

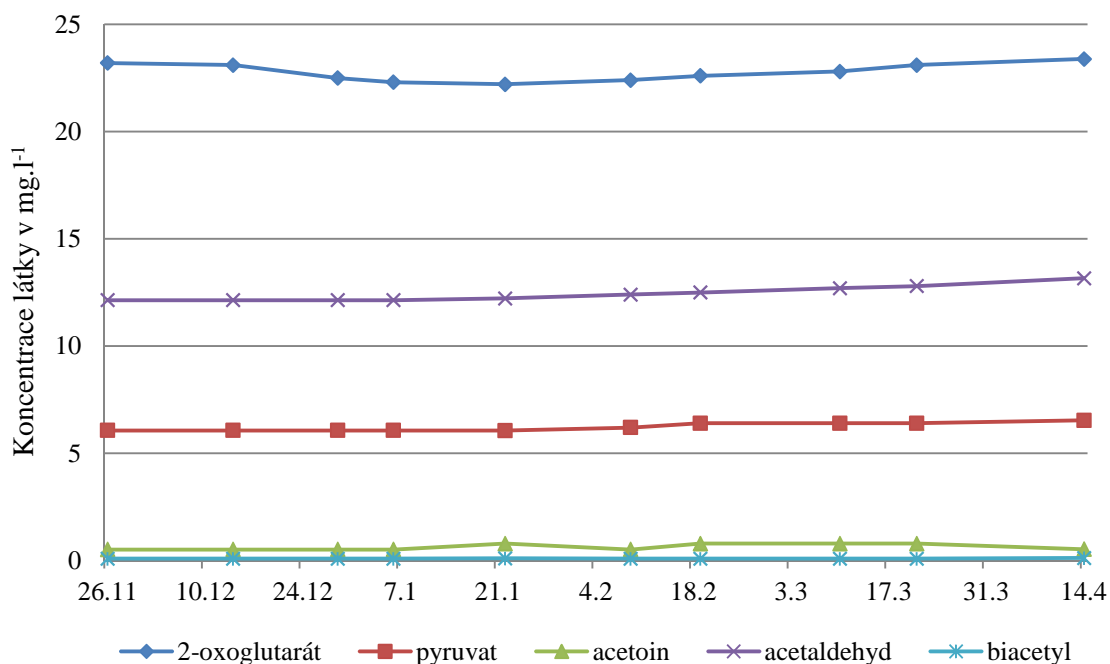
5.3.1 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 0-0



Graf 10: Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 0-0

Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 0-0 jasně poukazuje na mikrobiální činnost během pokusu. Křivka acetoinu názorně ukazuje dynamiku jablečno-mléčné fermentace, s touto křivkou je spojena křivka diacetylu, který je také produkován při MLF. Zajímavý je vývoj acetaldehydu u této varianty, kdy nejprve obsah acetaldehydu stoupl a v momentě, kdy se zvýšila produkce acetoinu bakteriemi křivka acetaldehydu začala klesat. Během MLF se tedy spotřebovává acetaldehyd. Hodnoty 2-oxoglutarátu však nejprve klesaly, ale posléze se ustálily.

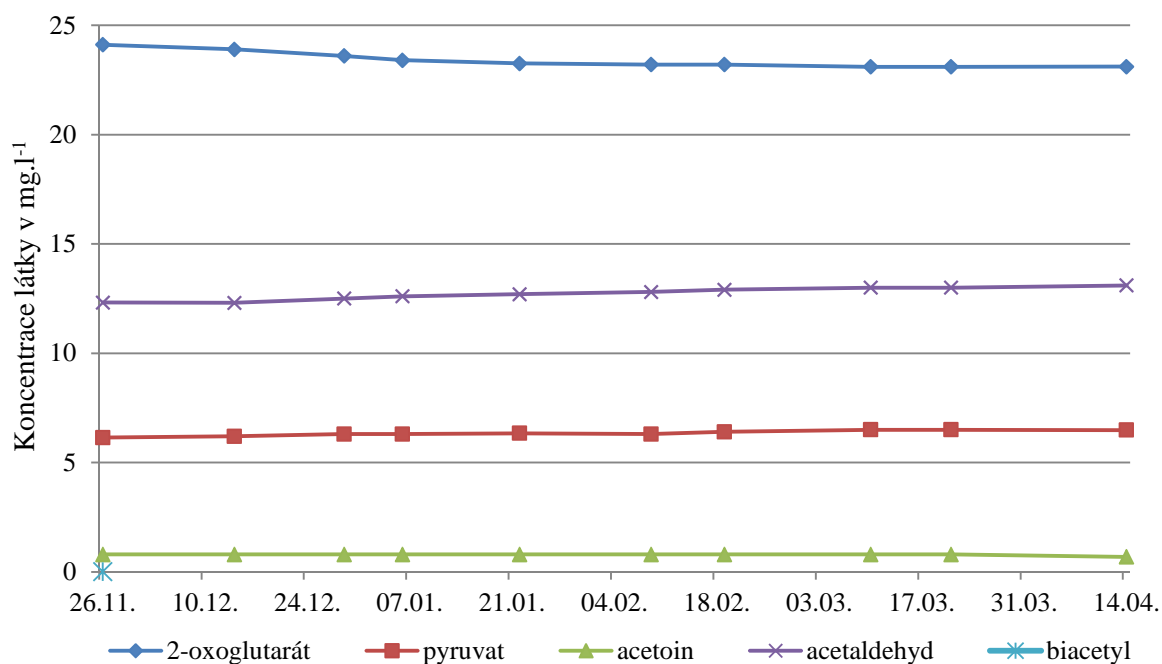
5.3.2 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 0-30



Graf 11: Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 0-30

Tento graf ukazuje, že všechny hodnoty měřených karbonylových sloučenin jsou téměř konstantní. Vývoj acetaldehydu, však mírně stoupá. Toto navýšení o 1,1 mg.l⁻¹ během celého pokusu je způsobeno mírnou oxidací vína. Hodnoty acetoinu a biacetylu jsou velmi nízké, až zanedbatelné, může jít o odchylku měření. Křivka kyseliny 2-oxoglutarové mírně poklesla v první části pokusu, tento jev je spojen s poklesem volného SO₂.

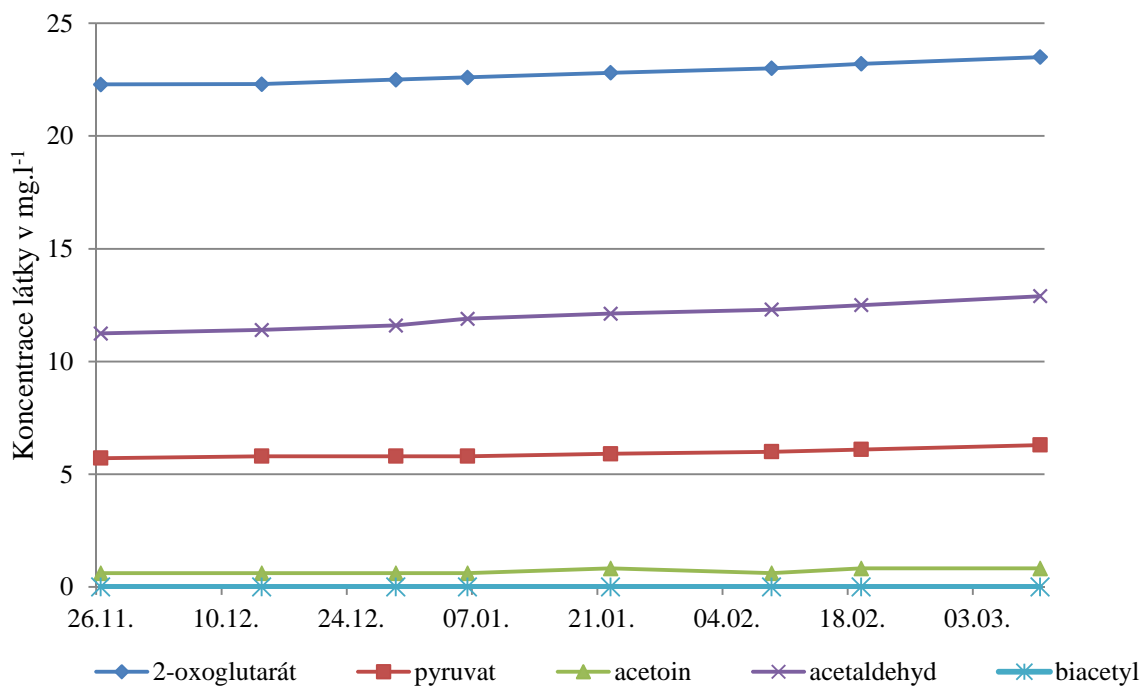
5.3.3 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 0-60



Graf 12: Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 0-60

Z grafu vyplývá, že naměřené hodnoty karbonylových sloučenin nemají dynamický vývoj. Hodnoty kyseliny pyrohroznové a acetoinu jsou konstantní. Obsah kyseliny 2-oxoglutarové mírně klesá, avšak jen o 1 mg.l⁻¹. Hladina acetaldehydu je téměř neměnná, vzhledem k vysokým hodnotám SO₂ je tento jev vysvětlitelný.

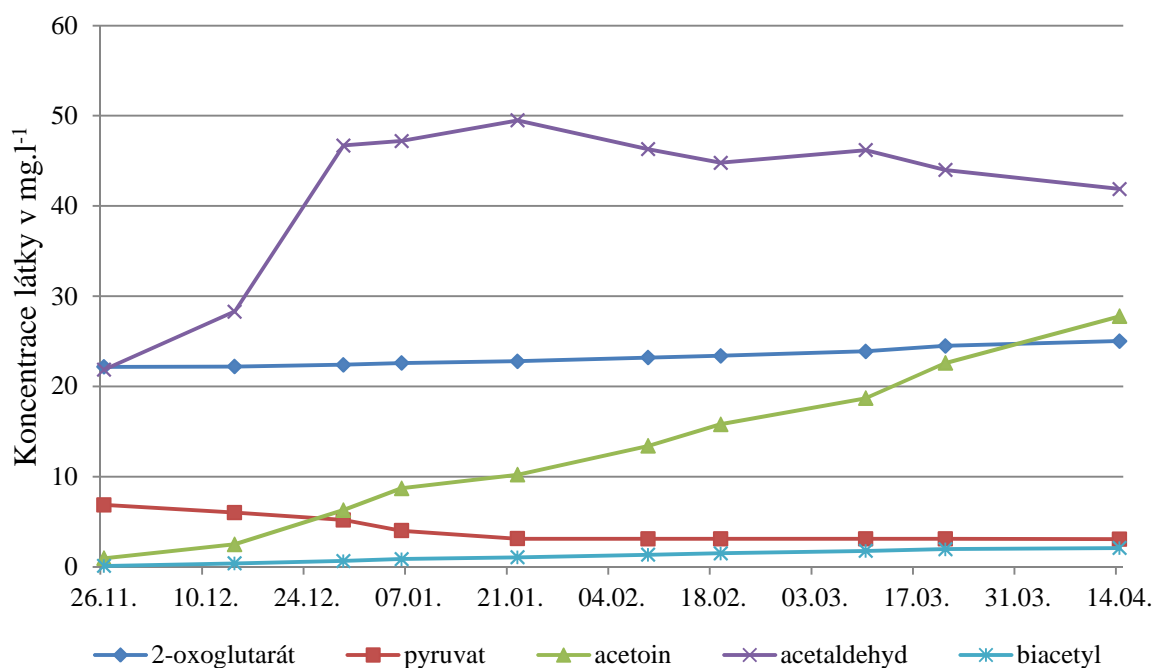
5.3.4 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 0-90



Graf 13: Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 0-90

Z grafu vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 0-90 je patrné, že má podobný vývoj jako grafy u předchozích variant. Acetaldehyd s kyselinami: 2-oxoglutarovou a pyrohroznovou, mají velice podobný narůstající vývoj, dá se říci, že spolu korespondují.

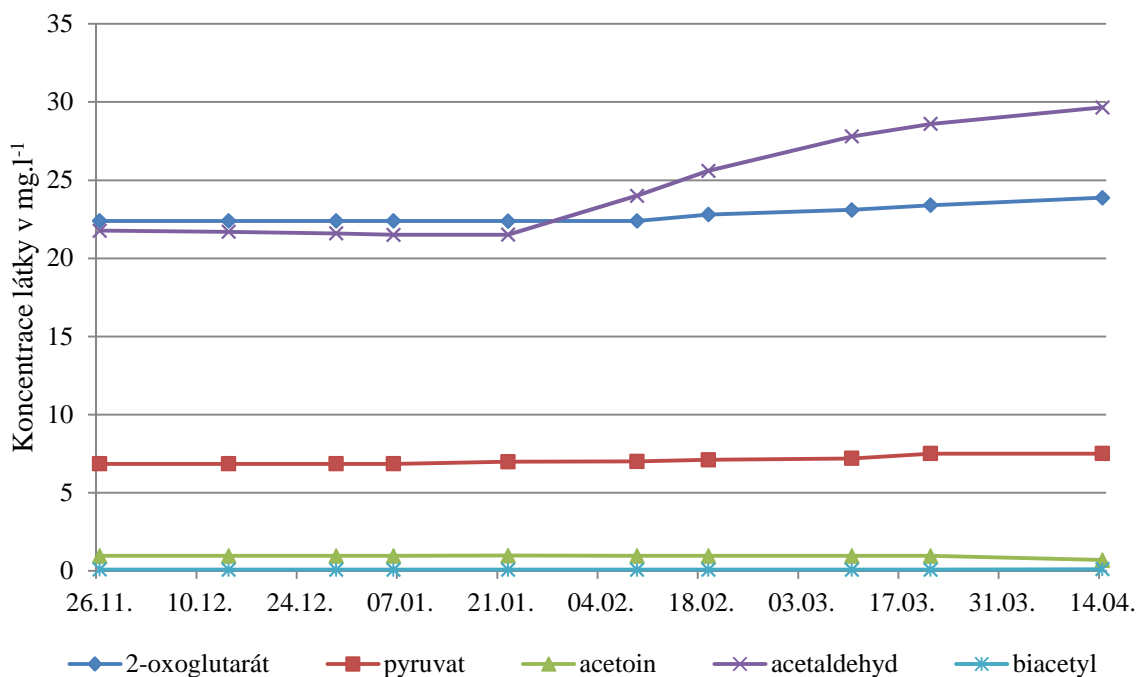
5.3.5 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 60-0



Graf 14: Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 60-0

Tento graf jasně dokazuje mikrobiální činnost octových bakterií. Hodnoty acetaldehydu zprvu rychle rostou, to poukazuje na rychlou oxidaci vína a následně pomalu klesají. Hodnoty kyseliny 2-oxoglutarové jsou téměř stálé. Křivka acetoinu však pomalu roste a hodnoty kyseliny pyrohroznové mírně klesají. Je zde tedy jasná činnost octových bakterií, které metabolizují pyruát na acetoin.

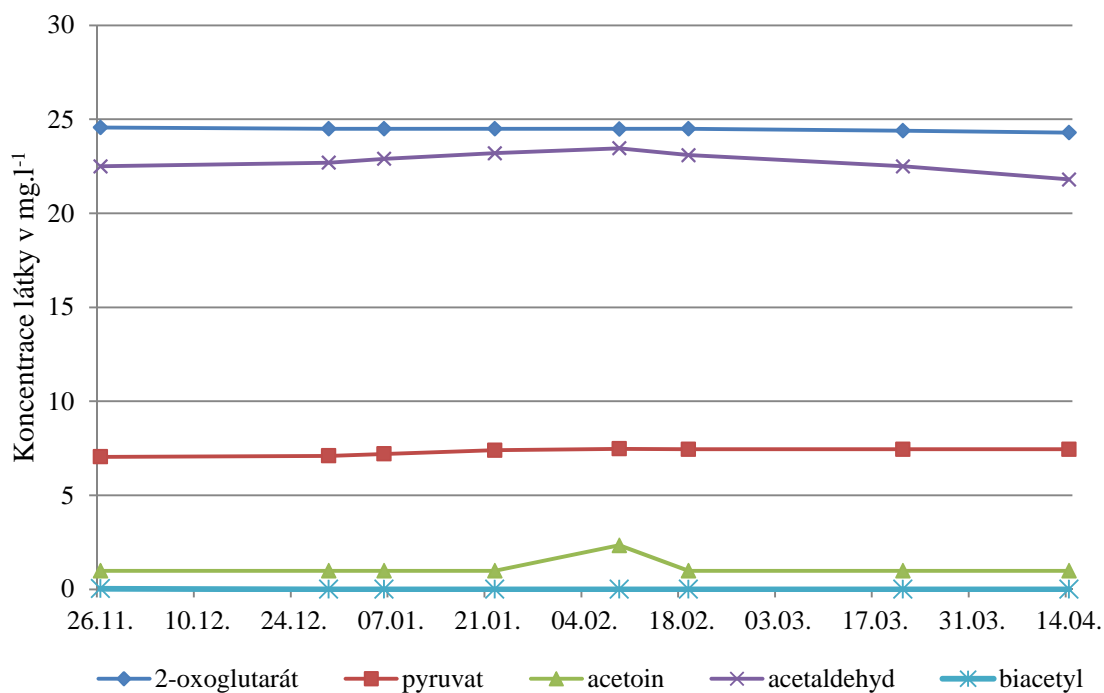
5.3.6 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 60-30



Graf 15: Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 60-30

Na tomto grafu je zřejmé, že kyselina pyrohroznová a 2-oxoglutarová byl stejný vývoj. Křivka acetaldehydu, však byla nejprve stálá a ve druhé polovině pokusu, byl zaznamenán značný nárůst o 8,1 mg.l⁻¹. Tento nárůst je způsoben možnou netěsností zátky nádoby, ve které bylo víno skladováno. Hodnoty acetoinu a biacetylu byly naměřeny v zanedbatelných koncentracích.

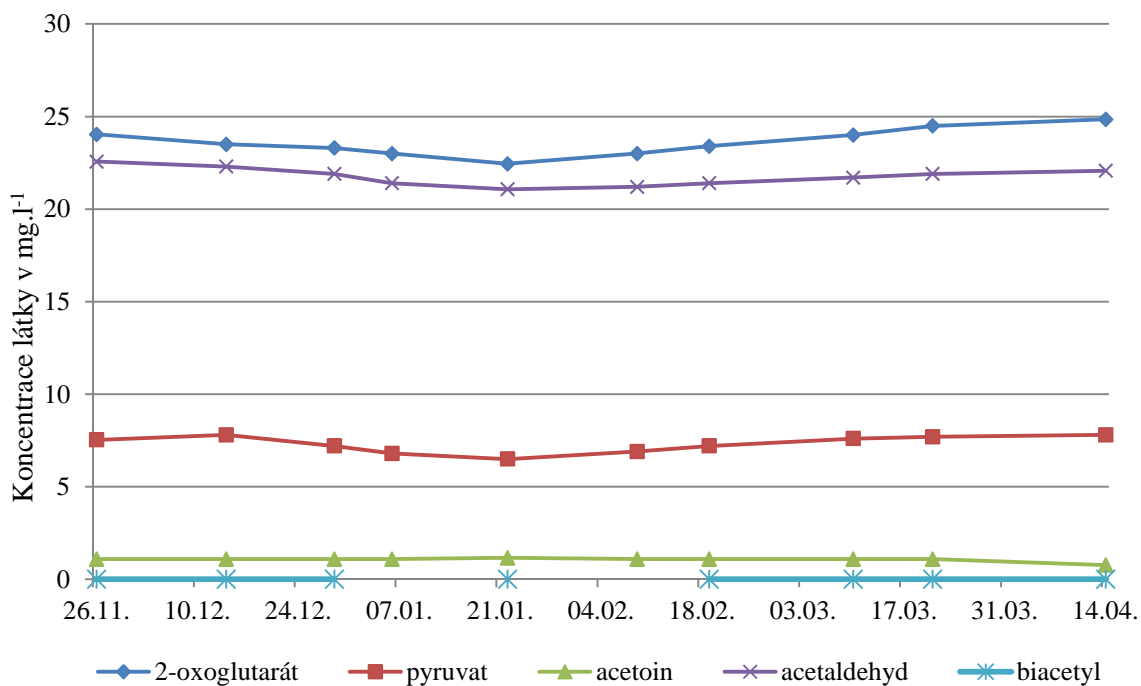
5.3.7 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 60-60



Graf 16: Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 60-60

Z tohoto grafu je patrné, že nejvyšší naměřenou karbonylovou sloučeninou je kys. 2-oxoglutarová. Acetaldehyd, tedy nepřevyšuje hodnoty této kyseliny, což je způsobeno reduktivním prostředím a vyšší koncentrací SO₂. U křivky acetoinu byla zaznamenána odchylka, zřejmě se jedná o chybu měření.

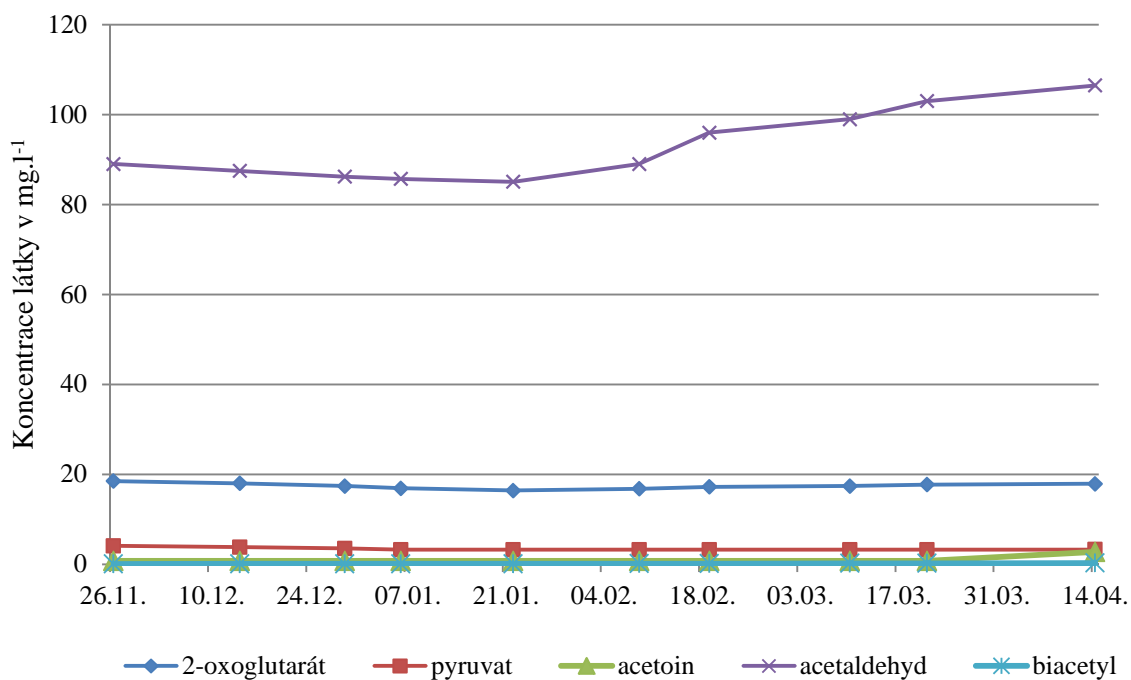
5.3.8 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 60-90



Graf 17: Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 60-90

Z tohoto grafu lze vyčíst, že hodnoty acetaldehydu, kys. pyrohroznové a kys. 2-oxoglutarové spolu korespondují. Paradoxně v první části pokusu, kdy byly zaznamenány velké poklesy volného SO₂, mírně klesaly i kyselina pyrohroznová, 2-oxoglutarová a acetaldehyd.

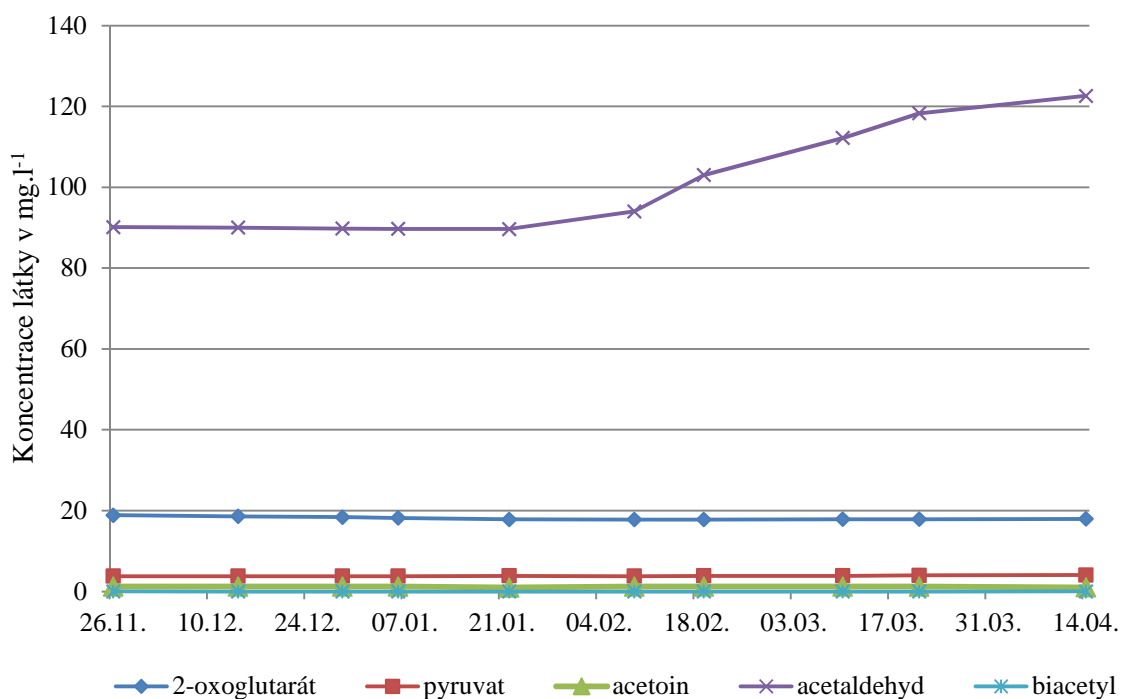
5.3.9 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 120-0



Graf 18: Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 120-0

Tento graf ukazuje, že všechny měřené karbonylové sloučeniny mají stejný vývin. Odlišuje se pouze acetaldehyd, jehož hodnoty ve druhé polovině pokusu mírně stoupají, to je zapříčiněno pozvolnou oxidací vína.

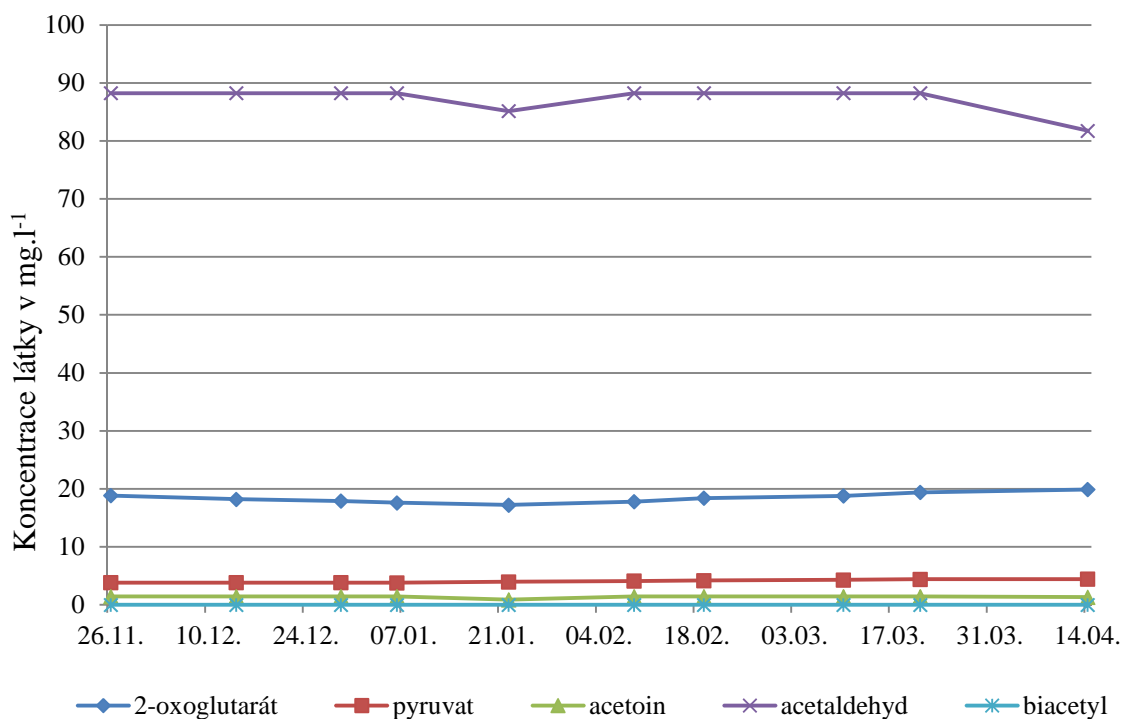
5.3.10 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 120-30



Graf 19: Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 120-30

Tento graf má podobný průběh jako graf předchozí varianty 120-0. V první fázi pokusu se křivka acetaldehydu nijak nevyvíjela, ve druhé části mírně rostla. Ostatní karbonylové sloučeniny se vyvíjely konstantně.

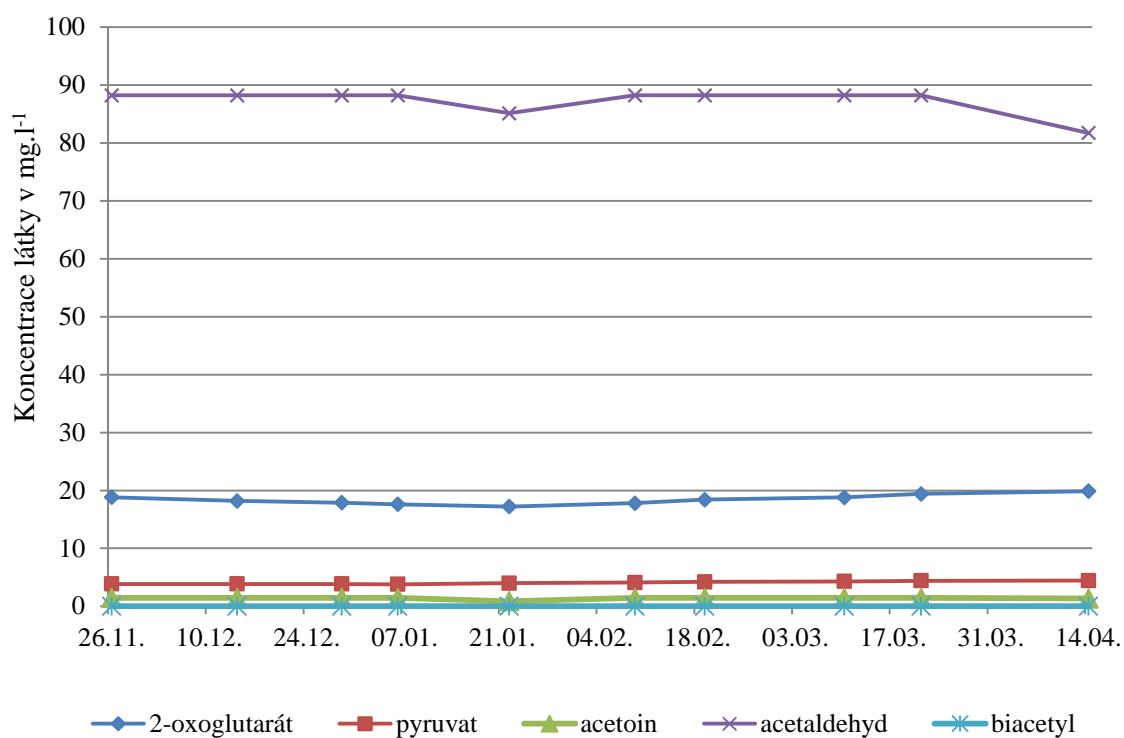
5.3.11 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 120-60



Graf 20: Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 120-60

Na tomto grafu je patrné, že hodnoty acetaldehydu jsou nejvyšší a vyvíjí se konstantně. Neměnný vývin mají i ostatní karbonylové sloučeniny.

5.3.12 Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 120-90



Graf 21: Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 120-90

Na tomto grafu je patrné, že hodnoty acetaldehydu jsou nejvyšší a jeho vývoj je neměnný. Konstantní vývoj mají i ostatní karbonylové sloučeniny.

Tabulka 4 – Naměřené hodnoty karbonylových sloučenin v mg.⁻¹

Datum	Sloučenina	0-0	0-30	0-60	0-90	60-0	60-30	60-60	60-90	120-0	120-30	120-60	120-90
26. 11. 2015	Kys. 2-oxoglutarová	21,97	23,20	24,11	22,28	22,17	22,39	24,57	24,04	18,51	18,86	19,33	18,84
	Kys. pyrohroznová	6,46	6,07	6,14	5,71	6,86	6,85	7,05	7,53	4,09	3,77	4,05	3,84
	Acetoin	0,74	0,52	0,79	0,62	0,96	0,96	0,99	1,09	0,73	1,21	2,07	1,43
	Acetaldehyd	11,11	12,14	12,32	11,24	21,85	21,77	22,50	22,57	89,03	90,14	93,87	88,24
	Biacetyl	0,14	0,09	0,00	0,00	0,11	0,09	0,03	0,00	0,06	0,05	0,01	0,00
14. 12. 2015	Kys. 2-oxoglutarová	21,10	23,10	23,90	22,30	22,20	22,39	24,50	23,50	18,00	18,60	18,80	18,20
	Kys. pyrohroznová	6,20	6,07	6,20	5,80	6,00	6,85	7,10	7,80	3,80	3,77	4,10	3,84
	Acetoin	0,79	0,52	0,79	0,62	2,5	0,96	0,99	1,09	0,73	1,21	2,07	1,43
	Acetaldehyd	11,1	12,14	12,3	11,4	28,3	21,7	22,7	22,3	87,5	90	93,87	88,24
	Biacetyl	0,14	0,09	0,00	0,00	0,38	0,08	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00
29. 12. 2015	Kys. 2-oxoglutarová	20,3	22,50	23,60	22,50	22,40	22,39	24,50	23,30	17,40	18,40	18,10	17,90
	Kys. pyrohroznová	5,7	6,07	6,3	5,8	5,2	6,85	7,2	7,2	3,5	3,77	4,1	3,84
	Acetoin	1,21	0,52	0,79	0,62	6,3	0,96	0,99	1,09	0,73	1,21	2,07	1,43
	Acetaldehyd	11,8	12,14	12,5	11,6	46,7	21,6	22,9	21,9	86,2	89,8	93,87	88,24
	Biacetyl	0,21	0,09	0,00	0,00	0,65	0,08	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00
6. 1. 2016	Kys. 2-oxoglutarová	19,4	22,30	23,40	22,60	22,60	22,39	24,50	23,00	16,90	18,20	17,50	17,60
	Kys. pyrohroznová	5,1	6,07	6,3	5,8	4	6,85	7,4	6,8	3,22	3,77	4,1	3,80
	Acetoin	1,86	0,52	0,79	0,62	8,7	0,96	0,99	1,09	0,73	1,21	2,07	1,43
	Acetaldehyd	12,3	12,14	12,6	11,9	47,2	21,5	23,2	21,4	85,7	89,7	93,87	88,24
	Biacetyl	0,28	0,09	0,00	0,00	0,86	0,08	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00
22. 1. 2016	Kys. 2-oxoglutarová	18,05	22,21	23,25	22,81	22,80	22,38	24,50	22,45	16,39	17,86	16,28	17,22
	Kys. pyrohroznová	4,62	6,06	6,33	5,91	3,12	6,98	7,48	6,49	3,22	3,87	3,41	3,97
	Acetoin	2,72	0,79	0,80	0,83	10,21	0,98	2,34	1,16	0,72	0,99	1,09	0,87
	Acetaldehyd	13,26	12,22	12,70	12,13	49,50	21,51	23,46	21,07	85,07	89,65	92,35	85,14
	Biacetyl	0,35	0,10	0,05	0,00	1,07	0,08	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00

Tabulka 5 – Naměřené hodnoty karbonylových sloučenin v mg.⁻¹

Datum	Sloučenina	0-0	0-30	0-60	0-90	60-0	60-30	60-60	60-90	120-0	120-30	120-60	120-90
9. 2. 2016	Kys. 2-oxoglutarová	18,10	22,40	23,20	23,00	23,20	22,39	24,50	23,00	16,80	17,80	16,90	17,80
	Kys. pyrohroznová	5,40	6,20	6,30	6,00	3,10	7,00	7,45	6,90	3,22	3,80	4,1	4,10
	Acetoin	6,58	0,52	0,79	0,62	13,4	0,96	0,99	1,09	0,73	1,21	2,07	1,43
	Acetaldehyd	11,1	12,40	12,8	12,3	46,3	24	23,1	21,2	89	94	90,87	88,24
	Biacetyl	0,56	0,09	0,00	0,00	1,34	0,08	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00
19. 2. 2016	Kys. 2-oxoglutarová	18,2	22,60	23,20	23,20	23,40	22,80	24,40	23,40	17,20	17,80	17,40	18,40
	Kys. pyrohroznová	6,2	6,40	6,4	6,1	3,1	7,1	7,45	7,2	3,22	3,87	4,1	4,20
	Acetoin	8,48	0,79	0,80	0,83	15,8	0,96	0,99	1,09	0,73	1,21	2,07	1,43
	Acetaldehyd	9,6	12,50	12,9	12,5	44,8	25,6	22,5	21,4	96	103	89,87	88,24
	Biacetyl	0,68	0,09	0,00	0,00	1,51	0,08	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00
10. 3. 2016	Kys. 2-oxoglutarová	18,3	22,80	23,10	23,40	23,90	23,10	24,30	24,00	17,40	17,90	18,00	18,80
	Kys. pyrohroznová	7,6	6,40	6,5	6,2	3,1	7,2	7,45	7,6	3,22	3,87	4,1	4,30
	Acetoin	11,37	0,79	0,80	0,83	18,7	0,96	0,99	1,09	0,73	1,21	2,07	1,43
	Acetaldehyd	7,4	12,70	13	12,8	46,2	27,8	21,8	21,7	99	112,2	87,87	88,24
	Biacetyl	0,93	0,09	0,00	0,00	1,77	0,08	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00	0,00
21. 3. 2016	Kys. 2-oxoglutarová	18,4	23,10	23,10	23,50	24,50	23,40	23,50	24,50	17,70	17,90	18,50	19,40
	Kys. pyrohroznová	8,6	6,40	6,5	6,3	3,1	7,5	7,45	7,7	3,22	4	4,1	4,40
	Acetoin	15,42	0,79	0,80	0,83	22,6	0,96	0,99	1,09	0,73	1,21	2,07	1,43
	Acetaldehyd	6,8	12,80	13	12,9	44	28,6	20,4	21,9	103	118,3	84,87	88,24
	Biacetyl	1,18	0,09	0,00	0,00	1,97	0,08	0,00	0,00	0,21	0,00	0,00	0,00
14. 4. 2016	Kys. 2-oxoglutarová	18,47	23,39	23,11	23,62	25,03	23,88	22,94	24,85	17,87	17,96	19,06	19,89
	Kys. pyrohroznová	9,32	6,54	6,49	6,36	3,07	7,50	7,45	7,80	3,25	4,07	4,34	4,43
	Acetoin	18,02	0,53	0,68	0,98	27,77	0,69	1,00	0,77	2,74	1,00	1,19	1,32
	Acetaldehyd	5,02	13,16	13,10	13,07	41,88	29,65	20,22	22,08	106,51	122,62	83,07	81,75
	Biacetyl	1,41	0,12	0,04	0,04	2,09	0,11	0,00	0,00	0,27	0,03	0,00	0,00

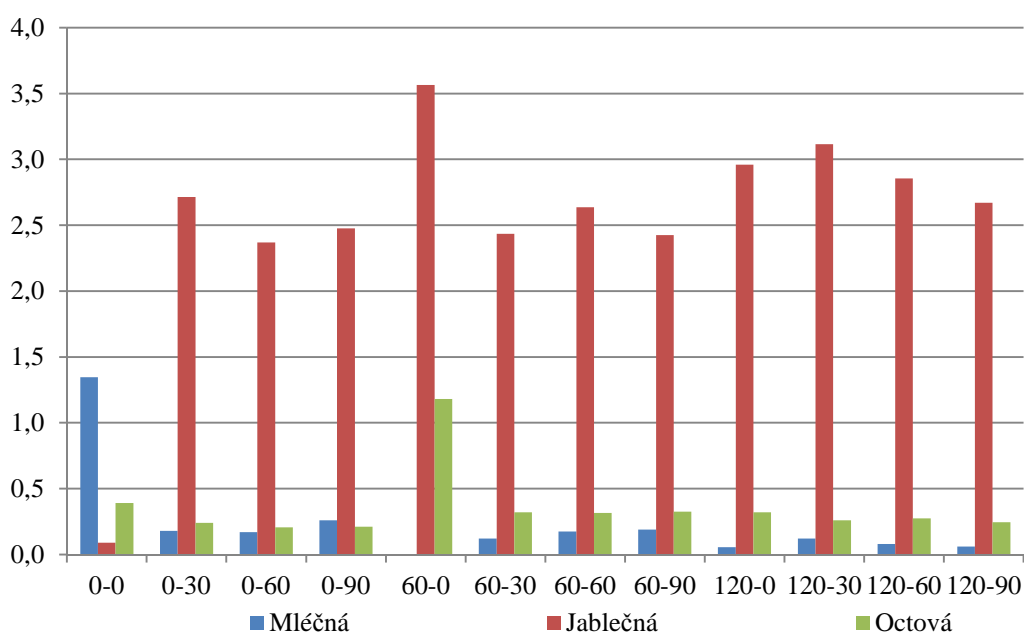
5.4 Analytický rozbor vín

Experimentální vína byla podrobena analytickému rozboru základních parametrů. Jednotlivé parametry byly vyhodnoceny a stanoveny na přístroji ALPHA v laboratoři na Ústavu vinohradnictví a vinařství v Lednici. Rozbor proběhl 15.4. 2015. U vín nebyly velké analytické rozdíly, kromě obsahu kyseliny jablečné, mléčné a octové.

Tabulka 6 – Analytický rozbor vín

Měřená veličina	Hodnoty	Odchylka měření
Alkohol	12.5 %	± 0.1 %
Kyseliny	8.4 g.l ⁻¹	± 0.2 g.l ⁻¹
Hodnota pH	3.2	± 0.05
Redukující cukry	1.8 g.l ⁻¹	± 0.5 g.l ⁻¹

5.4.1 Obsah kyseliny jablečné, mléčné a octové



Graf 22: Graf obsahu kyseliny mléčné, jablečné a octové

Z grafu lze vyčíst, že obsah kyseliny jablečné je u všech variant téměř stejný. Větší navýšení můžeme zaznamenat u varianty 60-0. Přístroj Alpha analyzátor měřil vyšší hodnoty kyseliny jablečné u vín, jejichž obsah kyseliny octové je vyšší. Naopak nejnižší koncentrace byla naměřena u varianty 0-0, kdy vlivem mléčných bakterií byla kyselina jablečná transformována na kyselinu mléčnou, ta je nejvyšší právě u této varianty. Kyselina mléčná u ostatních variant je ve velmi malých koncentracích, tento jev se dá zdůvodnit odchylkou měření. Co se týče kyseliny octové, u varianty 60-0 byla naměřena nejvyšší hodnota $1,18 \text{ g.l}^{-1}$ je to jasný důkaz mikrobiální činnosti během průběhu pokusu.

6. Diskuze

Senzorická analýza, prokázala rozdíly v aromatickém profilu vín ve spojitosti s různými koncentracemi SO₂. U variant, které nebyly po dokončení alkoholové fermentace sířeny, došlo k oxidaci, čili ke zvýšení koncentrace volného acetaldehydu, ten negativně ovlivnil aroma vín. (Zoecklein, 1995) Dále varianta 0-0 vykazovala největší míru mléčných tónů, to je způsobeno mikrobiální činností mléčných bakterií. Dále se ukázala korelace mezi intenzitou barvy vín a intenzitou oxidu siřičitého. S vyšší koncentrací SO₂ klesá intenzita barvy vín. (Michlovský, 2012) Také ze sensorické analýzy vyplývá, že nejodrudovější charakter měly varianty, které byly během pokusu sířeny 30 mg.l⁻¹ volného SO₂. Vyšší dávky oxidu siřičitého negativně ovlivňovaly odrudový charakter a aroma vín. (Michlovský, 2012) Toto bylo potvrzeno i stobodovou stupnicí, kdy vína s obsahem 30 mg.l⁻¹ získala nejvíce bodů.

Vývoj volného oxidu siřičitého, byl v jednotlivých variantách odlišný. Hlavní faktor pro vývoj volného SO₂ měla počáteční koncentrace ve rmutu, potažmo v moštu. V první třetině pokusu byly poklesy volného SO₂ všeobecně vyšší, než u zbylé části. Na volný oxid siřičitý se totiž vázaly látky vzniklé alkoholovou fermentací. Hodnoty veškerého SO₂ korespondovaly s koncentracemi volného SO₂, jehož hladina byla udržována během pokusu. Největší naměřené hodnoty veškerého oxidu siřičitého měla varianta 120-90. Hamerník (2010) potvrzuje, že přidání dávky SO₂ do moštu před kvašením, rapidně navyšuje obsah celkového SO₂. Kvasinky při alkoholové fermentaci produkují acetaldehyd, který se navazuje na SO₂. Je to jejich přirozená obranyschopnost právě vůči SO₂. (Ribéreau-Gyoun a kol., 2006b)

Výsledky kapalinové chromatografie ukázaly, že vývoj měřených karbonylových sloučenin, především kyseliny pyrohroznové, 2-oxoglutarové a acetaldehydu byl téměř konstantní. Rozdílné byly jen varianty, které nebyly sířeny po dokončení alkoholové fermentace a varianty, které ovlivnila mikrobiální aktivita.

U varianty 0-0 byl zaznamenán pokles acetaldehydu a nárůst acetoinu, což je způsobeno činností bakterií mléčného kvašení. (Jackowetz, 2012) U varianty 60-0 byl také naměřen rapidní nárůst acetoinu a pozvolný pokles kyseliny pyrohroznové.

V tomto případě se jedná o činnost octových bakterií, které metabolizují acetoin, právě z kyseliny pyrohroznové. (Ribéreau-Gyoun a kol., 2006)

Síření vína a především moštu mělo velký vliv na vznik jednotlivých karbonylových sloučenin. Kyselina 2-oxoglutarová byla nejvíce naměřena ve variantách, kdy byl rmut sířen 0 a 60 mg.l⁻¹. U variant kde byl rmut sířený na 120 mg.l⁻¹, byl obsah této sloučeniny o 4-5 mg.l⁻¹ menší. Podobně se vyvíjela i kyselina pyrohroznová. Ve variantách kde byl rmut sířen 0 a 60 mg.l⁻¹ byla naměřena o 2-3 g.l⁻¹ vyšší koncentrace kyseliny pyrohroznové, než u varianty kde byl rmut sířený 120 mg.l⁻¹ volného SO₂. V porovnání obsahu těchto dvou karbonylových sloučenin jasně vede kyselina 2-oxoglutarová nad pyruátem, toto potvrzuje ve své práci i Holka (2015). Literatura však uvádí, že se obecně ve vínech vyskytuje více kyseliny pyrohroznové 10-500 mg.l⁻¹, než kyseliny 2-oxoglutarové (2-350 mg.l⁻¹). (Usseglio-Tomasset, 1995) Tento jev si lze vysvětlit tím, že molární hmotnost kyseliny pyrohroznové je 88,35 g/mol a 2-oxoglutarové je 146,11 g/mol. Kyselina 2-oxoglutarová je tedy těžší a kapalinovou chromatografií byla detekována ve větších koncentracích v mg.l⁻¹.

Vliv síření vína na vznik karbonylových sloučenin se nejlépe projevil u přítomnosti acetaldehydu. Nejnížší hodnoty byly naměřeny u variant, kde rmut nebyl sířen vůbec (RMUT 0), vyšší hodnoty acetaldehydu měly varianty RMUT 60. Nejvyšší obsah acetaldehydu byl naměřen u variant, jejichž rmut byl sířen 120 mg.l⁻¹ volného SO₂ (RMUT 120), toto potvrzuje i (Holka, 2015). Velké koncentrace acetaldehydu jsou způsobeny přirozenou obranyschopností kvasinek před oxidem siřičitým, který je inhibuje. Kvasinky tak produkují více acetaldehydu, který je navázán na volný SO₂. (Ribéreau-Gyoun a kol., 2006)

Dále bylo zaznamenáno, že u variant, které byly sířeny dávkou 60 mg.l⁻¹ a 90 mg.l⁻¹ volného SO₂ ve víně, byl obsah acetaldehydu téměř konstantní. Stálý vývoj křivky acetaldehydu způsobuje extrémní redukční potenciál koncentrací SO₂ ve vínech. Hladina acetaldehydu stoupala pouze u variant, které nebyly sířeny vůbec, anebo u variant, které byly sířeny 30 mg.l⁻¹ SO₂ ve víně. Tento nárůst byl však mírný a byl způsoben pozvolnou oxidací vína. (Michlovský, 2012)

Výjimečný vývoj acetaldehydu ve vínech byl zaznamenán u variant 0-0 a 60-0. Křivka acetaldehydu u varianty 0-0 nejprve mírně stoupala, a poté začala prudce klesat, rozdíl mezi nejvyšší hodnotou a nejnižší byl 7,2 mg.l⁻¹. Tento pokles je způsoben aktivací mléčných bakterií, které při jablečno-mléčné fermentaci degradují acetaldehyd, jak ve vázané, tak i ve volné formě. (Osbourne, 2000) U varianty 60-0 byl naměřen, u dvou prvních odběrů, rapidní nárůst acetaldehydu, který se intenzivně vázal na SO₂.

Dalšími karbonylovými sloučeninami jsou acetoin a diacetyl. Tyto sloučeniny byly naměřeny ve stopovém množství ve všech variantách, acetoin je totiž syntetizován kvasinkami během alkoholové fermentace. Romano a Suzzi (1996) uvádí, že kvasinky *Sacharromyces c.* dokáží produkovat do 12 mg.l⁻¹ acetoinu. Největší hodnoty acetoinu však vykazovaly varianty 0-0 (18 mg.l⁻¹) a 60-0 (27,7 mg.l⁻¹), které byly vyprodukovány výše zmíněnou mikrobiální činností. Tento fakt potvrzuje i analytický rozbor vín, kdy varianta 0-0 obsahovala 0 g.l⁻¹ kyseliny jablečné a 1,35 g.l⁻¹ kyseliny mléčné. Varianta 60-0 zase 1,18 g.l⁻¹ kyseliny octové.

7. Závěr

Oxid siřičitý je stále časté diskutované téma. Jeho vyšší dávky ve víně mají nepříznivé účinky na lidské zdraví, a tak se výrobci snaží vyrábět vína s co nejmenšími koncentracemi SO_2 . Oxid siřičitý je nejúčinnější ve své volné a molekulární formě. Pokud se naváže na karbonylové sloučeniny, ztrácí tak svou funkci a musí, být doplněn.

V této práci bylo potvrzeno, že přidaná dávka oxidu siřičitého do moštu před kvašením výrazně ovlivňuje tvorbu acetaldehydu. Tato karbonylová sloučenina se váže na oxid siřičitý a je hlavním faktorem obsahu celkového oxidu siřičitého.

Dále bylo zjištěno, že síření vína nemá velký vliv na vznik sloučenin vázající SO_2 ve víně. Největší spojitost, síření vína se vznikem karbonylových sloučenin, byla u acetaldehydu. Kdy u vín s nízkými koncentracemi SO_2 byl zaznamenán pozvolný nárůst obsahu acetaldehydu. Obsah kyselin pyrohroznové a 2-oxoglutarové byl po celou dobu konstantní. Naopak dynamický vývoj sledovaných sloučenin bylo možné sledovat u vín s určitou mikrobiální aktivitou.

Síření vína má malý vliv na vznik sloučenin vázajících SO_2 ve víně. Mnohem podstatnější je vliv síření moštů před kvašením.

8. Souhrn

Tato závěrečná práce se zabývá vznikem karbonylových sloučenin ve víně v závislosti na síření vína. Zkoumá tedy jaký má vliv síření moštu a vína na vznik karbonylových sloučenin. Pojednává o vlastnostech a formách oxidu siřičitého. Dále se podrobně věnuje karbonylovým sloučeninám, které se váží právě s oxidem siřičitým.

V práci bylo zjištěno, že vliv síření vína nemá velký vliv vznik karbonylových sloučenin. Naopak se potvrdilo, že počáteční koncentrace SO_2 v moštu výrazně ovlivňuje tvorbu acetaldehydu, který se váže na oxid siřičitý. Dále se ratifikovalo, že větší vliv na tvorbu karbonylových sloučenin má činnost mikroorganismů ve víně, než různé koncentrace SO_2 .

Klíčová slova: Oxid siřičitý, karbonylové sloučeniny, acetaldehyd, ketokyseliny

9. Resumé

This thesis is concerned with the formation of carbonyl compounds in wine, depending on the spread of wine. Therefore examines what influences the spread of musts and wines on the formation of carbonyl compounds. Discusses the characteristics and forms of sulfur dioxide. Further detail the carbonyl compounds which bind just with sulfur dioxide.

In this work it was found that the influence of the spread of the wine has no great influence formation of carbonyl compounds. On the contrary, it was confirmed that the initial SO_2 concentration in the must greatly affects the formation of acetaldehyde, which binds sulfur dioxide. Furthermore ratified the greater influence on the formation of carbonyl compounds, the activity of microorganisms in the wine than different concentrations of SO_2 .

Key words: sulphu dioxide, carbonyl compounds, acetaldehyde, keto acids

10. Zdroje

BALÍK, Josef. *Vinařství: návody do laboratorních cvičení*. Vyd. 3., nezměn. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004. ISBN 8071579335.

BALÍK, Josef. *Vinařství: návody do laboratorních cvičení*. 2. nezm.vyd. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004. ISBN 8071578096.

BAROŇ, Mojmir. *Možnosti snížení obsahu oxidu siřičitého v technologii réвовých vín: Possibilities of sulfur dioxide reduction [i.e. reduction] in wine technology : původní vědecká práce*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2013. Folia Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. ISBN 9788073759247.

BOTTAZZI, V., Battistotti, B., & Montescani, G. (1973). *Influence des souches seules et associées de L. bulgaricus et Str. thermophilus ainsi que des traitements du lait sur la production d'aldéhyde acétique dans le yaourt*. Lait, 53, 295–308.

BLOUIN J. (1995) C.R. Journ´ee Technique du CIVB, Bordeaux, France.

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

DELFINI, Claudio a Joseph V. FORMICA. *Wine microbiology: science and technology*. New York: Marcel Dekker, c2001. ISBN 0824705904.

ELIAS, R. J., V. F. LAURIE, S. E. EBELER, J. W. WONG a A. L. WATERHOUSE. *Analysis of selected carbonyl oxidation products in wine by liquid chromatography with diode array detection*. Analytica Chimica Acta [online]. 2008, vol. 626, issue 1, s. 104-110 [cit. 2015-04-17]. DOI: 10.1016/j.aca.2008.07.048.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267008013883>

FARKAŠ, Ján. *Biotechnológia vína*. Bratislava: Alfa, 1983. Edícia potravinárskej literatúry (Alfa).

FLAMINI, R. *Changes in carbonyl compounds in Chardonnay and Cabernet Sauvignon wines as a consequence of malolactic fermentation. Vitis* 41. 2002, 107–112.

HAMERNÍK, J. 2010. Vplyv síření na vznik sloučenin vázajících SO₂ ve vině. Lednice. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně.

HORNSEY, Ian S. *The chemistry and biology of winemaking*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, c2007. ISBN 9780854042661.

HUTKINS, Robert W. *Microbiology and technology of fermented foods*. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2006. IFT Press series.

JACKOWETZ, J.N. Metabolism of SO₂ binding compounds by *Oenococcus oeni* during and after malolactic fermentation in white wine. *Department of Food Science*. USA: Cornell University.

KOBLIŽKA, Vojtěch. *Metodika sběru a zpracování hroznů na ústavu 556*. Lednice na Moravě, Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně. 2013

KRATOCHVIL, František. *1000 a 111 pojmů o víně, révě vinné a vinařství, aneb, Breviř enofila*. Mikulov: Moravín, svaz moravských vinařů, 2013. ISBN 9788026051237.

KRAUS, Vilém. *Vinitorium historicum*. Praha: Radix, 2009. ISBN 9788086031873.

KRAUS, Vilém, Zuzana FOFFOVÁ a Bohumil WURM. *Nová encyklopedie českého a moravského vína*. Praha: Praga Mystica, 2008. ISBN 8086767000.

Margalith, P. Z. (1981). *Flavour Microbiology*. Springfield, Illinois: Charles C. Thomas Publishers.

MICHLOVSKÝ, Miloš. *Lexikon chemického složení vína: příručka praktického vinaře*. Rakvice: Vinselekt Michlovský, (2014a). ISBN 9788090531925.

MICHLOVSKÝ, M. *Oxid siřičitý v enologii*. Vyd. 1. Rakvice: Vinselekt Michlovský, 2012, 151 s. ISBN 978-80-905319-0-1.

MICHLOVSKÝ, Miloš. *Bobule*. Rakvice: Vinselekt Michlovský, (2014b). ISBN 9788090531932.

MICHLOVSKÝ, Miloš. *Příprava bílých vín*. Rakvice: Vinselekt Michlovský, (2014c). ISBN 9788090531949.

MICHLOVSKÝ, Miloš, SEDLO, Jiří (ed.). *Encyklopedie degustace vína*. Rakvice: Vinselekt Michlovský, 2013. ISBN 9788090531918.

MINÁRIK, Erich. *Chémia a mikrobiológia vína*. Bratislava: Príroda, 1986.

MOLIKI, D. a S. SHARMA. HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC). [online]. 2014 [cit. 2015-04-17]. Dostupné z: http://www.academia.edu/8873343/High_Performance_Liquid_Chromatography

Nařízení Rady (ES) č. 479/2008 ze dne 29. dubna 2008 o společné organizaci trhu s vínem, o změně nařízení (ES) č. 1493/1999, (ES) č. 1782/2003, (ES) č. 1290/2005 a (ES) č. 3/2008 a o zrušení nařízení (EHS) č. 2392/86 a (ES) č. 1493/1999, v platném znění.

Nařízení komise č. 607/2009 ze dne 10. Července 2009

OSBORNE, J.P., R. MIRA DE ORDUNA, G.J. PILONE a S.-Q. LIU. Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2000, vol. 191, issue 1, s. 51-55. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09318.x.

USSEGLIO-TOMASSET L. *Chimie oenologique*. Tec and Doc Lavoisier, Paris. (1995)

POLO, M. Carmen a María Victoria MORENO-ARRIBAS (eds.). *Wine chemistry and biochemistry*. New York: Springer, c2009. ISBN 9780387741185.

RANKINE, B. *Making GoodWine*. Pan Macmillan Australia, Sydney, pp. (2002). 87–117.

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

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

RICHTER, Miloslav a Ivana LUDVÍKOVÁ. *Malý obrazový atlas odrůd ovoce*. Lanškroun: TG Tisk, c2004. ISBN 8090348777.

ROMANO, P. a G. SUZZI. Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 1996, roč. 62, č. 2, s. 309-315.

SNELTEN, H. J., SCHAAFSMA, G. *Health aspects of oral sulphite, and sulphite in wine*. (1992) *Voeding*, 53, 88–90.

SPONHOLZ W.R., Dittrich, H.H., 1985. *Origin of gluconic, 2-oxo-gluconic and 5-oxogluconic, glucuronic and galacturonic acids in musts and wines*. *Vitis* 24, 51–58.

SAIDANE D¹, Barbe J.C., Birot M., Deleuze H. *Reducing the sulfur-dioxide binding power of sweet white wines by solid-phase extraction* *Food Chem.* 2013 Nov 1;141(1):612-5. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.03.031. Epub 2013 Mar 20.

STEIDL, Robert. *Sklepní hospodářství*. V českém jazyce vyd. 2., aktualiz. Překlad Jiří Sedlo. Valtice: Národní vinařské centrum, 2010. ISBN 9788090320192.

VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 8086659011.

Spracovanie hrozna: Učeb. pre 2. a 3. roč. SPOŠ a SOU. Bratislava: Príroda, 1990. ISBN 8007003134.

Vyhláška č. 117/2011 Sb., kterou se mění vyhláška č. 113/2005 Sb., o způsobu označování potravin a tabákových výrobků, ve znění pozdějších předpisů

Metabolism of SO₂ binding compounds by Oenococcus oeni during and after malolactic fermentation in white wine. Cornell University.

ZOECKLEIN, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., & Nury, F. S. (1995). *Wine Analysis and Production*. New York, USA: Kluwer Academic/Aspen Publishers.

11. Seznam tabulek

Tabulka 1 <i>Nárůst aktivního oxidu siřičitého (Blouin, 1995)</i>	15
Tabulka 2 – <i>Hodnotící tabulka senzoričké analýzy</i>	40
Tabulka 3 – <i>Hodnoty volného oxidu siřičitého</i>	48
Tabulka 4 – <i>Naměřené hodnoty karbonylových sloučenin v mg.⁻¹</i>	62
Tabulka 5 – <i>Naměřené hodnoty karbonylových sloučenin v mg.⁻¹</i>	63
Tabulka 6 – <i>Analytický rozbor vín</i>	64

12. Seznam obrázků

Obr. 1: <i>Formy oxidu siřičitého ve víně</i>	14
Obr. 2: <i>Reakce aldehydové skupiny s volným SO₂</i>	20
Obr. 3: <i>Dekarboxylace pyruvátu na acetoin octovými bakteriemi (Ribéreau-Gyoun a kol., 2006)</i>	23
Obr. 4 : <i>Piktogram pro označení SO₂ na etiketě (zdroj: NKEU 579/2012)</i>	27
Obr. 5 : <i>Schéma experimentu</i>	34

13. Seznam grafů

Graf 1: <i>Vývoj koncentrace kyseliny glukonové vlivem napadení bobule <i>B. cinerea</i> a kombinací s octovými bakteriemi (Ribéreau-Gayoun a kol., 2006b)</i>	25
Graf 2: <i>Bodové hodnocení vín</i>	41
Graf 3: <i>Graf vyhodnocení senzoričké analýzy vín 1</i>	42
Graf 4: <i>Graf vyhodnocení senzoričké analýzy vín 2</i>	43
Graf 5: <i>Graf vyhodnocení senzoričké analýzy vín 3</i>	44
Graf 6: <i>Vývoj volného oxidu siřičitého ve vínech</i>	45
Graf 7: <i>Vývoj volného oxidu siřičitého ve vínech</i>	46
Graf 8: <i>Vývoj volného oxidu siřičitého ve vínech</i>	47
Graf 9: <i>Hodnoty veškerého oxidu siřičitého ve vínech</i>	49
Graf 10: <i>Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 0-0</i>	50
Graf 11: <i>Vývoj karbonylových sloučenin ve variantě 0-30</i>	51
Graf 12: <i>Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 0-60</i>	52

Graf 13: <i>Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 0-90</i>	53
Graf 14: <i>Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 60-0</i>	54
Graf 15: <i>Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 60-30</i>	55
Graf 16: <i>Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 60-60</i>	56
Graf 17: <i>Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 60-90</i>	57
Graf 18: <i>Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 120-0</i>	58
Graf 19: <i>Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 120-30</i>	59
Graf 20: <i>Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 120-60</i>	60
Graf 21: <i>Graf vývoje karbonylových sloučenin ve variantě 120-90</i>	61
Graf 22: <i>Graf obsahu kyseliny mléčné, jablečné a octové</i>	65