



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

KVASINKY V PROCESU VÝROBY VÍNA

YEASTS IN WINE MAKING PROCESS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Daniela Horká

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Dana Vránová, Ph.D.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK1064/2015** Akademický rok: **2015/2016**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Daniela Horká**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie (2901R021)
Vedoucí práce **Mgr. Dana Vránová, Ph.D.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Kvasinky v procesu výroby vína

Zadání bakalářské práce:

1. Vyhledat dostupnou literaturu na zadané téma
2. K identifikaci kvasinek v kvasicím moštu využít molekulárně biologické metody založené na PCR
3. Ke sledování chemických změn v kvasicím moštu využít spektrofotometrických metod
4. Shrnout získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Daniela Horká
Student(ka)

Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

Abstrakt:

Tato bakalářská práce se zabývá sledováním vlivu kvasinek na proces výroby vína a na jeho konečné vlastnosti. Byla provedena izolace a identifikace kvasinek ve vzorku moštu odrůdy Veltlínské zelené s využitím základních mikrobiologických operací a molekulárně-biologické metody založené na PCR – RFLP. V další části práce bylo provedeno sledování chemických změn v kvasícím moštu odrůdy Hibernal pomocí spektrofotometrických metod. Měřenými parametry bylo pH a celková antioxidační aktivita kvasícího moštu. Při výrobě vína Hibernal byla použita autochtonní kvasinka izolovaná v loňském roce v naší laboratoři z povrchu bobulí.

V rámci literární rešerše byla vyhledána odborná literatura k zadanému tématu, v práci je pak stručně popsána historie vinařství, charakteristika révy vinné, morfologická stavba a chemické složení hroznů, jednotlivé fáze technologie výroby vína, závěrečné úpravy vína a principy využitých metod.

Abstract:

This bachelor thesis deals with an observation of yeasts cell influence on the wine production process and also on its final property. Yeast cell isolation and identification from Green Veltliner wine variety of grape juice were made. Basic microbiological operations and molecular – biological methods based on PCR – RFLP were used. Monitoring of chemical changes in fermented Hibernal variety of grape juice with using spectrophotometric method was carried out. The total antioxidant activity of fermented grape juice and pH were the parameters which were measured. Autochtonous yeast which was isolated from the berries surface in our laboratory last year was used during production of the Hibernal variety of grape juice.

Specialized literature for the chosen topic were analysed within this thesis. Moreover, history of wine production, grapevine characteristics, morphological structure and chemical composition of grapes were described. Partial stages of the wine production technology, final wine modification and principles of used methods were investigated at the end of the thesis.

Klíčová slova:

Víno, alkoholové kvašení, chemická analýza vína, PCR, PCR – RFLP

Keywords:

Wine, alcoholic fermentation, chemical analysis of wine, PCR, PCR – RFLP

HORKÁ, D. *Kvasinky v procesu výroby vína*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 55 s. Vedoucí bakalářské práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Daně Vránové, Ph.D. za její čas, ochotu, rady a odborné vedení práce. Děkuji Fakultě chemické za vytvoření pracovních podmínek a možnost realizovat tuto práci. V neposlední řadě chci poděkovat své rodině a mým přátelům za podporu, bez které by tato práce nemohla vzniknout. Mé poděkování také patří vinařství Štěpána Maňáka a soukromému vinaři za poskytnuté vzorky.

Obsah

Abstrakt:	3
Abstract:	3
Klíčová slova:	3
Keywords:	3
1 Úvod	8
2 Teoretická část	9
2.1 Historie vinařství a révy vinné	9
2.2 Charakteristika révy vinné	9
2.2.1 Morfologie a fyziologie révy vinné	10
2.3 Choroby révy vinné	10
2.4 Zákon o vinohradnictví a vinařství	11
2.5 Odrůdy révy vinné a vinařské oblasti v ČR	11
2.5.1 Vinařské oblasti a podoblasti v České republice	12
2.5.2 Charakteristiky odrůd analyzovaných vín	13
2.6 Chemické složení hroznů	15
2.6.1 Voda	15
2.6.2 Sacharidy	16
2.6.3 Organické kyseliny	16
2.6.4 Minerální látky	17
2.6.5 Fenolické látky	18
2.6.6 Aromatické látky	19
2.6.7 Dusíkaté látky	20
2.6.8 Enzymy	20
2.7 Technologie výroby vína	21
2.7.1 Vinobraní	22
2.7.2 Přejímka a zpracování hroznů	23
2.7.3 Úprava moštu pro kvašení	25
2.8 Kvašení moštu	27
2.9 Zrání vína	28
2.10 Školení vína	28
2.10.1 Síření vína	28
2.10.2 Číření vína	28
2.10.3 Filtrace vína	28
2.11 Vinné kvasinky	29
2.12 Vady vína	30
2.12.1 Pachuť po plísních	30

2.12.2	Pachut' po korku	30
2.12.3	Pachut' po třapínách.....	31
2.12.4	Reduktivní aroma – sirka	31
2.12.5	Křísovatění	31
2.12.6	Myšina.....	31
2.12.7	Vláčkovatění – slizovatění	31
2.12.8	Octovatění	31
3	Metody zkoušení vína a identifikace kvasinek	32
3.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	32
3.2	Stanovení polymorfizmu délky restričních fragmentů u produktů PCR	33
3.2.1	Zpracování výsledků v programu BioNumerics	33
3.3	Stanovení pH	34
3.4	Stanovení celkové antioxidační aktivity	34
4	Experimentální část	35
4.1	Použité přístroje a pomůcky	35
4.2	Chemikálie.....	35
4.3	Analyzované vzorky vína	36
4.4	Příprava kultivačních médií	36
4.4.1	Sladinový agar	36
4.4.2	Sladinové médium s antibiotikem	37
4.5	Příprava pracovních roztoků.....	37
4.5.1	Příprava roztoku DPPH.....	37
4.5.2	Příprava 0,5 M EDTA o pH 8	37
4.5.3	Příprava 10×TBE pufru	37
4.5.4	Příprava 1×TBE pufru	37
4.5.5	Příprava EtBr.....	37
4.5.6	Příprava 1×TBE pufru s ethidium bromidem.....	37
4.5.7	Příprava délkového standardu 100 bp	37
4.5.8	Příprava PCR směsi.....	37
4.5.9	Příprava 2% agarózového gelu.....	38
4.5.10	Příprava 3 M octanového pufru.....	38
4.5.11	Příprava 80 % ethanolu	38
4.6	Pracovní postupy	38
4.6.1	Izolace čisté kultury kvasinek	38
4.6.2	Izolace DNA.....	39
4.6.3	PCR	39
4.6.4	Elektroforetická detekce PCR produktů.....	40

4.6.5	Přečištění PCR produktů	40
4.6.6	Restrikční analýza	41
4.6.7	Stanovení pH.....	41
4.6.8	Stanovení celkové antioxidační kapacity	41
5	Výsledky a diskuze.....	42
5.1	Identifikace kvasinek pomocí PCR -RFLP	42
5.1.1	Kultivace kvasinek	42
5.1.2	Izolace DNA.....	42
5.1.3	Amplifikace DNA pomocí PCR.....	42
5.1.4	Restrikční analýza	43
5.1.5	Genetická podobnost kvasinek izolovaných ze vzorků mladého vína odrůdy Veltlínské zelené	46
5.2	Stanovení pH	47
5.3	Stanovení celkové antioxidační aktivity	48
6	Závěr.....	50
7	Seznam použité literatury	51
8	Seznam použité online literatury pro obrázky.....	54
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	55

1 Úvod

Víno se považuje za božský nápoj již od dob starého Egypta, Řecka a Říma. Jeho nejstarší archeologické nálezy jsou asi 7000 let staré. Do Čech a na Moravu se víno rozšířilo díky římským legionářům v 2. – 3. století a v současnosti je vinařství a vinohradnictví velice žádaným a rozvíjejícím se oborem. Avšak tento atraktivní obor má velmi přísná pravidla daná zákonem o vinařství a vinohradnictví č. 321/2004 Sb. v aktuálním znění a unijními pravidly, která se musí striktně dodržovat, aby nedocházelo k falšování vína, přidávání nežádoucích aditivních látek apod.

Na rozvoji tohoto výrobního odvětví mají svůj podíl také molekulárně – biologické metody založené na analýze DNA pomocí polymerázové řetězové reakce, které jsou schopny identifikovat celou škálu různých druhů kvasinek o specifických vlastnostech. Prodáváných komerčních kvasinek je v dnešní době nepřehledné množství a díky nim lze vyrobit vína s požadovaným aromatickým profilem nebo typickými odrůdovými vlastnostmi. Molekulárně – biologické metody rozšířily obzory celosvětového vinařství, avšak vedou k jisté uniformitě vyráběných vín. Výhodou komerčních kvasinek jsou jejich přesně definované vlastnosti jako inkubační a inaktivační teplota, produkce specifického aroma atd., což vinařům pomáhá lépe řídit průběh kvasného procesu, ale i předem určit sensorické vlastnosti vyráběného vína. Vína s komerčními kvasinkami jsou většinou velmi aromatická a tím ztrácí svůj typický odrůdový charakter, avšak zákazníci tento typ vín vyhledávají čím dál častěji, a proto je to jeden z důvodů proč vinaři tyto kvasinky úspěšně používají.

Jiný směr zastávají ti vinaři, kteří nechávají vinný mošt zkvasit kvasinkami přímo z dané vinice. Tyto kvasinky se nazývají autochtonní. Tímto rozhodnutím vinaři podporují alternativní cesty, jak navrátit vínu typickou chuť a charakter vycházející z dané odrůdy a daného regionu tzv. terroir. Pojmem terroir se označuje přesně vymezené stanoviště pro pěstování vinné révy se všemi faktory, co na něj působí. Mezi nejdůležitější parametry terroir patří geologické podloží vinice, půdní podmínky a klimatické, kulturní nebo historické faktory. Platí, že čím přesnější a užší je označení původu vína, tím více narůstá jeho výsledná kvalita [1].

Cílem této práce bylo vypracování literární rešerše o technologii výroby vína, izolace a identifikace autochtonních kvasinek ze vzorku dokvašeného moštu odrůdy Veltlínské zelené a sledování změn pH a antioxidační aktivity ve vzorcích moštů odrůdy Hibernál během kvasného procesu.

2 Teoretická část

2.1 Historie vinařství a révy vinné

Lidská civilizace zná vinohradnictví a vinařství od nepaměti, a proto je víno již odedávna zařazeno mezi nejdéle známé alkoholické nápoje a vinná réva se považuje za jednu z nejstarších kulturně pěstovaných rostlin. Původ révy vinné (*Vitis vinifera*) je datován do doby před 150 miliony let. Výroba vína se začala pravděpodobně vyvíjet v období 5000 – 8000 let před naším letopočtem, neboť se v horských oblastech Kavkazu a Íránu našly archeologické nálezy a také semena révy vinné, které tuto skutečnost dokazují. Dalšími oblastmi, které výrobu vína započaly, jsou Mezopotámie a Egypt. Z Egypta se dochovalo velké množství důkazů, které výrobu vína potvrzují. Jsou to různé malby, amfory s informacemi o víně nebo záznamy na hrobech faraonů. V Egyptě bylo víno považováno za božský nápoj a faraonové ho také používali k různým rituálům. Z Egypta se vinná réva lehce rozšířila po celé Evropě. Uvádí se, že se na jejím rozšíření podíleli Asyřané, Feničané, Sumerové, Babyloňané, staří Keltové a Římané. Právě Římané měli na výrobu vína a jeho rozvoj velký vliv, neboť víno připravovali různými způsoby, přidávali do něj směsi medu, bylin a koření, aby měla vína svou specifickou chuť. Na Moravu se réva vinná dostala také díky Římanům, kteří zde vedli boje se střední Evropou. Pověsti praví, že vojáci z římské legie míchali vodu, kvůli hygienickým důvodům, s vínem, které si přiváželi ze své říše. Tento způsob byl ale příliš nákladný, a proto založili na Pálavských kopcích nové vinice [1].

Na našem území se vinná réva začala pěstovat asi v období 8. – 11. století, velký vliv na rozšíření vinné révy měly hlavně kláštery, které víno používaly pro své liturgické obřady. Ve 14. století za vlády Karla IV. došlo k velkému rozvoji a rozšíření pěstování vinné révy. Karel IV. moravské vinaře velmi podporoval, protože byl sám velkým příznivcem vína. Z této doby také pochází první zákonné předpisy o víně [2, 8].

2.2 Charakteristika révy vinné

Víno se definuje jako: „Výrobek, který byl získán výhradně úplným nebo částečným alkoholovým kvašením čerstvých, rozdrcených a nerozdrcených vinných hroznů nebo hroznového moštu“. Obsah alkoholu (ethanolu) ve víně se udává nejméně 8,5 % obj. alkoholu a nejvýše 15 % obj. alkoholu [3].

Réva vinná – *Vitis vinifera* – patří do čeledi révovitých (*Vitaceae*), tato čeleď se rozšířila po celé Severní Americe, Evropě a také Asii. Rod *Vitis* zahrnuje asi 60 druhů těchto popínavých rostlin. Odrůdy jsou šlechtěné pro mnohá využití, nejčastěji však pro sklizeň hroznů nebo slouží jako ozdobná dekorace, a to díky svým podzimním, pestrobarevně zbarveným listům. *Vitis vinifera* je jediným zástupcem ze Středomoří, pochází z oblasti mezi Středozezemím a Černým mořem. Původně réva vinná rostla v lesích, roklicích a na březích potoků, neboť zde měla mírné a vlhké klimatické podmínky, ale postupem času se z keřovité rostliny stala popínavá rostlina a to kvůli nedostatku světla a tepla v lesních porostech. Liánovitý růst této rostlině umožnil vyšplhat se do korun ostatních stromů a tímto způsobem čerpat světlo a teplo slunečních paprsků [6, 7].

2.2.1 Morfologie a fyziologie révy vinné

Bobule hroznů se skládá ze tří základních částí, a to jsou dužnina, slupka a zrníčka (pecičky). Stopka (třapina) obsahuje velké množství fenolických a aromatických látek, které spolu s taninem, dřevitými látkami, tříslovinami, minerálními látkami a organickými kyselinami při nakvácení negativně ovlivňují chuť moštu. Z tohoto důvodu se stalo odstraňování třapin jednou z předpřípravných fází při zpracování hroznů u bílého vína, a později také u některých odrůd červeného vína.

Slupka bobule – bývá barevná podle dané odrůdy révy a typu vína, ale vždy je na jejím povrchu voskový obal, který ji chrání proti nepříznivým vlivům okolí a zmenšuje odpařování vody. U bílých vín má slupka obvykle zelenou až žlutozelenou barvu, avšak sytost je ovlivněna zralostí bobule. Tloušťka slupky bobule ovlivňuje hlavně výlisnost moštu. Slupky obsahují především cukry, organické kyseliny, třísloviny a barviva. U bílých vín jsou nejčastěji žlutozelená až jantarová a z chemického hlediska patří mezi flavony [4, 9, 10].

Dužnina bobule – je pro výrobu vína stěžejní částí. Většinou bývá bezbarvá a masitá, obsahuje totiž cévní svazky (asi 8 %) a zbytek dužniny tvoří sladká šťáva (mošt). Dužnina má stejně jako tloušťka slupky vliv na výlisnost moštu. Obsahuje především cukry (hroznový, ovocný) a kyseliny. Jejich obsah se liší především v rozdílnosti odrůd, půd, ročníku, poloze, a také zralosti hroznů.

Semena (pecičky) – jsou složeny z glyceridů, kyseliny stearové, palmitové a linolové, a také z tříslovin a hořkých látek. Právě kvůli tříslovinám a hořkým látkám se musí dávat pozor, aby při lisování nedošlo k rozdrčení semen, které by zhoršily vlastnosti moštu. Ze semen hroznů se také vyrábí oleje a vinný tanin [12, 15].

2.3 Choroby révy vinné

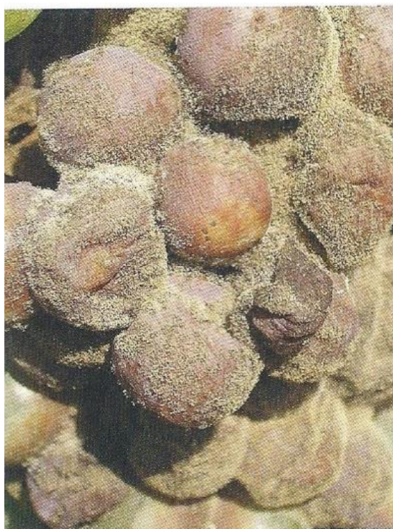
Choroby révy vinné se rozdělují do čtyř základních kategorií:

Virové choroby – nelze je diagnostikovat pouhým okem, ale je nutné sledování v pověřených laboratořích. Nejčastějšími projevy těchto chorob jsou oslabení růstu nebo úplné odumření keře, snížení produktivity a kvality hroznů (snížení cukernatosti) a podobně. Tyto choroby se šíří především díky tzv. přenašečům, nejčastěji jsou to háďátka, která napadají kořenový systém rostliny, ale mohou to být i mšice. Proti virovým chorobám neexistují žádné možnosti přímé ochrany. Nejznámějšími chorobami v našich vinicích jsou roncet a svinutka.

Bakteriální choroby – většinou způsobují těžká onemocnění révy a stejně jako u virových onemocnění se proti nim nelze přímo chránit. V našich vinicích je nejrozšířenější bakteriální chorobou bakteriální nádorovitost, která je způsobena bakterií *Agrobacterium vitis*.

Houbové choroby – patří mezi nejčastější choroby révy vinné. Do této skupiny patří plíseň révová, plíseň šedá (Obrázek 1) a padlí révové. Plíseň révová a padlí révové se nejčastěji projevují napadením listů, na kterých vytváří skvrny, které poté hnědnou a zasychají. Plíseň šedá napadá bobule v období zaměkání za deštivého počasí, kdy je pokrývá šedým povlakem. V suchém a teplém období mohou být bobule napadeny ušlechtilou formou této plísně a takto napadené bobule jsou zpracovávány na tokajská nebo výběrová

vína. Pro ochranu proti houbovým chorobám se používají tzv. fungicidy, které se dělí na kontaktní, které se používají preventivně, ale nemají léčebné účinky a systémové, které mají i léčebný účinek [15, 25].



Obrázek 1 Plíseň šedá [16]

2.4 Zákon o vinohradnictví a vinařství

Zákon č. 321/2004 Sb., v akt. znění o vinohradnictví a vinařství vzniknul na základě toho, aby vyhovoval normám a požadavkům Evropské unie, neboť právní normy u nás odpovídaly evropskému vinařskému právu pouze do počátku 40. let minulého století. Tento zákon přináší nová ustanovení oproti předešlým vinařským normám a to například:

- nové rozdělení vinařských oblastí na Čechy (2 podoblasti) a Moravu (4 podoblasti)
- maximální výnos z hektaru může být 12 tun za vinařský rok
- zakazuje přislažování vín přírodními nebo syntetickými sladidly (výjimkou je hroznový mošt)
- zakazuje konzervování vína chemickými látkami (výjimkou je SO₂)
- zakazuje zvětšování objemu a ovlivňování přirozených vlastností vína
- zakazuje používání syntetických barviv a aromatických látek
- rozděluje vína na víno stolní, víno jakostní podle stanovené oblasti a zavádí víno zemské, které je mezistupněm mezi vínem jakostním a vínem stolním [14].

2.5 Odrůdy révy vinné a vinařské oblasti v ČR

Odrůdy révy vinné se v České republice registrují podle svých vlastností a požadavkům pro růst v našich podmínkách a rozdělují se na dva typy: moštové a stolní odrůdy.

Moštové odrůdy jsou určeny pro výrobu vína nebo burčáku, jejich bobule jsou malé až střední velikosti, ale obsahují velké množství šťávy (jejich vylisnost bývá až 70 %).

Rozdělují se na 2 základní skupiny: bílé a modré moštové odrůdy.

- **Bílé moštové odrůdy** – Aurelius, Auxerrois, Chardonnay, Děvín, Hibernal, Irsai Oliver, Kerner, Lena, Malverina, Muškát moravský, Muškát Ottonel, Müller Thurgau, Neuburské, Pálava, Rulandské bílé, Rulandské šedé, Ryzlink rýnský, Ryzlink vlašský,

Sauvignon, Sylvánské zelené, Tramín červený, Veltlínské červené rané, Veltlínské zelené, Veritas, Vrboska

- **Modré moštové odrůdy** – Agni, Alibernet, André, Ariana, Cabernet Moravia, Cabernet Sauvignon, Domina, Dornfelder, Frankovka, Laurot, Merlot, Modrý Portugal, Neronet, Rubinet, Rulandské modré, Svatovavřínecké, Zweigeltrebe

Stolní odrůdy jsou určené především pro přímou konzumaci čerstvých hroznů.

- Stolní odrůdy – Arkadia, Diamant, Chrupka bílá, Chrupka červená, Julski Biser, Olšava, Panonia kincse, Pola, Vitra [15].

2.5.1 Vinařské oblasti a podoblasti v České republice

Na území České republiky se nachází 2 hlavní vinařské oblasti, a to vinařská oblast Čechy (vinařská zóna A) a Morava (vinařská zóna B).

Vinařská oblast Čechy je menší než Morava, její území leží v několika příznivých lokalitách, které se nachází v nižší nadmořské výšce, a to především kolem toků řek Vltavy, Berounky, Labe nebo Ohře. Zóna A se dále dělí na dvě vinařské podoblasti, mělnickou a litoměřickou. Dříve se Čechy dělily do šesti podoblastí: pražská, mělnická, čáslavská, mostecká, žemosecká a rudnická.

- Litoměřická podoblast se rozprostírá v severní části Čech v údolí řeky Labe. V této podoblasti převažuje pěstování bílých moštových odrůd, kterým se zde daří díky příznivým podmínkám, které řeka Labe vytváří. Z bílých moštových odrůd zde převažují Müller Thurgau, Ryzlink rýnský, Rulandské šedé a Rulandské bílé, z modrých odrůd se nejvíce pěstují Svatovavřínecké, Rulandské modré a Modrý Portugal.
- Mělnická podoblast se rozprostírá v okolí hlavního města Prahy a také západně od ní v údolí řeky Berounky. V této oblasti, stejně jako v litoměřické, převládá pěstování bílých moštových odrůd, modré odrůdy se pěstují pouze okrajově [1, 2].

Vinařská oblast Morava se nachází především na území Jihomoravského kraje a je ohraničená státní hranicí s Rakouskem a Slovenskou republikou. Dříve se Morava dělila na 10 vinařských podoblastí, které se později sloučily na 4 podoblasti: znojemskou, velkopavlovickou, mikulovskou a slováckou (Obrázek 2). V této oblasti se převážně pěstují bílé moštové odrůdy (cca 70 %), ale své zastoupení zde mají i modré odrůdy (cca 30 %).

- Znojemská vinařská podoblast se nachází, jak už název napovídá, převážně u města Znojma, ale částečně i v okrese Brno – venkov. Znojmo je již odedávna významným vinařským střediskem, důkazem jsou dlouhé chodby vinných sklepů přímo pod městem. Znojmsko je typické v pěstování bílých odrůd a to především Veltlínské zelené, Müller Thurgau, Ryzlink rýnský, Sauvignon a Pálava. Z modrých odrůd révy vinné zde převládají Svatovavřínecké, Frankovka, Zweigeltrebe a Rulandské modré.
- Mikulovská vinařská podoblast se rozkládá převážně v okrese města Břeclav, ale její vinařské obce se nachází i v okrese Brno – venkov. Tato oblast se vyznačuje svou vápenatou půdou, která je vhodná pro pěstování odrůd Chardonnay, Ryzlinku vlašského, Rulandského bílého a aromatických odrůd Pálava a Tramín červený.

- Velkopavlovická vinařská podoblast se nachází v Jihomoravském kraji, je tvořena pahorkatinou a půda je zde bohatá na hořčík. Díky tomu je půda vhodná pro pěstování modrých odrůd révy vinné, které dosahují velmi specifické chuti a vysoké kvality. Nejvíce rozšířené odrůdy jsou Svatovavřínecké, Frankovka, Modrý Portugal, Zweigeltrebe a Rulandské modré, z bílých odrůd potom Veltlínské zelené, Müller Thurgau, Ryzlink vlašský a Rulandské šedé. Pro tuto oblast jsou také typická růžová vína.
- Slovácká vinařská podoblast zasahuje do několika okresů Hodonín, Uherské Hradiště, Břeclav a Zlín. Podoblastí protéká řeka Morava, která jí dodává příznivé podmínky k pěstování velmi kvalitních bílých vín. Vína jsou aromatická a svěží díky optimálním klimatickým podmínkám v době zrání hroznů, střídají se zde teplé dny s chladnými nocemi [1, 2].



Obrázek 2 Mapa vinařských podoblastí v oblasti Morava [39]

2.5.2 Charakteristiky odrůd analyzovaných vín

Odrůda Veltlínské zelené – pochází pravděpodobně z Rakouska, tato odrůda je geneticky podobná odrůdám Tramín a St. Georgen. Patří mezi nejčastěji pěstované odrůdy u nás, a to především ve vinařské oblasti velkopavlovické a znojemské. Hrozen odrůdy Veltlínské zelené je malý až středně velký a velmi hustý, bobule na něm jsou malé až středně velké a jejich barva je žlutozelená. List je malý až středně velký, čepel je kruhovitá, pětilaločnatá s bočními výkroji (Obrázek 3). Roste především v hlinitých půdách s dostatečnou vlhkostí, sklizeň bývá pravidelná a středně vysoká. Tato odrůda je středně odolná proti poškození mrazem, ale je náchylná k napadení plísní révovou a padlí révovým. Bobule odrůdy Veltlínské zelené jsou vhodné pro výrobu příjemných, harmonických vín a také se často používají do směsí. Vůně se podobá lipovému květu, bílému pepři nebo broskvím [5, 22].



Obrázek 3 Hrozen a list odrůdy Veltlínské zelené [5]

Odrůda Hibernál – je středně pozdní až pozdní hybridní odrůda, která se řadí do bílých moštových odrůd. Byla vyšlechtěna v roce 1944 ve Výzkumném ústavu v Geisenheimu v Německu Dr. Helmutem Beckerem křížením dvou odrůd Seibel 7053 x Ryzlink rýnský. Tato odrůda dosahuje sklizňové zralosti v poslední dekádě října, 1 – 2 týdny před Ryzlinkem rýnským. Její název je odvozen z latinského slova „hiberna“, tedy „zima“, a proto velmi dobře odolává zimním mrazům až do $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$, a také nejružnějším škůdcům např. padlí révovému, plísní révové nebo plísní šedé. Tato odrůda je vhodná téměř do všech typů půd, nevadí jí ani vyšší obsah vápníku, avšak problémem jsou extrémně vysušené půdy. Má malé až středně velké bobule červenošedé barvy, ale hrozen je velmi hustý a má dlouhou stopku. List je velký srdcovitý s měkkými, bočními výkroji (Obrázek 4).

Bobule Hibernálu jsou ideální pro výrobu kvalitních přívlastkových vín, výběru z bobulí nebo biovín, ale je nutné tyto hrozny ponechat dlouho na keřích. Víno má podobný charakter jako Ryzlink rýnský, ale má o něco vyšší cukernatost a také vyšší úrodnost. Aromatická vůně po lipovém květu nebo broskvích dodává tomuto vínu svou specifickou chuť [5, 6, 12, 14].



Obrázek 4 Hrozen a list odrůdy Hibernál

2.6 Chemické složení hroznů

Chemické složení hroznů hraje velmi výraznou roli ve výsledné kvalitě vyráběného vína. Složení ovlivňuje odrůda vína, kvalita půdy, zralost bobulí a v neposlední řadě také klimatické podmínky daného regionu. Nejdůležitějšími organickými a anorganickými látkami bobulí hroznů a moštu jsou voda, sacharidy, organické kyseliny a aminokyseliny, které patří do skupiny primárních metabolitů. Aromatické a fenolické látky patří do sekundárních metabolitů. Nejdůležitější látky obsažené v bobulích znázorňuje Tabulka 1 [4, 16].

Tabulka 1 Nejdůležitější látky obsažené v bobulích hroznů révy vinné [15]

Obsahová látka	Obsah v moštu
Voda	780 – 850 g/l
Cukry	120 – 250 g/l
Kyselina	6 – 15 g/l
Minerální látky	2,5 – 5,0 g/l
Dusíkaté látky	0,2 – 1,4 g/l
Fenolické látky (barviva, taniny)	0,1 – 2,5 g/l
Vitamin B1 (Thiamin)	0,1 – 0,4 mg/l
Vitamin B2 (Riboflavin)	0,15 mg/l
Vitamin B6	0,1 – 0,4 mg/l
Kyselina pantothenová	0,35 – 0,75 mg/l
Vitamin C	8 – 30 mg/l

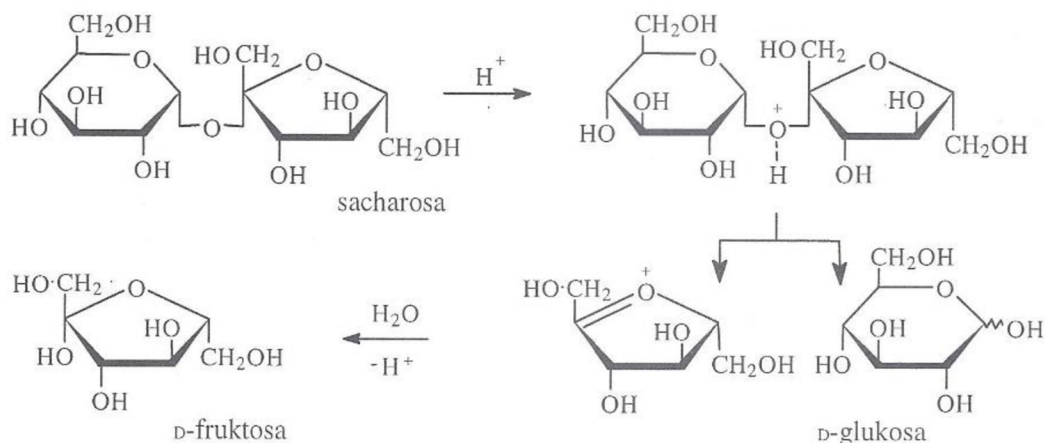
2.6.1 Voda

Voda je nejdůležitější součástí bobulí hroznů a moštu, slouží totiž jako rozpouštědlo pro ostatní významné látky. 1 litr moštu obsahuje asi 780 – 850 g vody. Tento obsah se však může snížit při zrání kvůli vypařování nebo při mrazu [2].

2.6.2 Sacharidy

V listech a v menším měřítku také v bobulích, které obsahují chlorofyl, se sacharidy tvoří procesem fotosyntézy, a to z oxidu uhličitého a vody, díky slunečnímu záření. Nejintenzivněji fotosyntéza probíhá při 30 °C a během tohoto procesu se uvolňuje kyslík. V prvním kroku se zde vytvoří hydratací triózy, tento krok se uskutečňuje přes kyselinu fosfoglycerolovou. Dále se triózy postupně přeměňují na hexózy. Dvě třetiny těchto cukrů se buď odbourávají při dýchacím procesu, nebo se přemění na složitější sloučeniny např. kyselina vinná, glykolová, manitol, sorbitol. Nejvíce cukrů se z listů transportuje ve fázi zrání a přezrávání [2, 4, 9].

Nejdůležitějším cukrem ve vinné révě je sacharóza, která se enzymaticky štěpí na glukózu (hroznový cukr) a fruktózu (ovocný cukr), schéma štěpení znázorňuje Obrázek 5. Tyto cukry jsou důležité pro alkoholové kvašení. Obsah glukózy mírně převažuje nad fruktózou, protože fruktóza se lehce oxiduje v dýchacím řetězci. Dalšími cukry, které se vyskytují v bobulích v malém množství, jsou nezkvasitelné pětiuhlíkaté monosacharidy (maltóza, galaktóza), nerozštěpená sacharóza a škrob, který je obsažen v třapínách. Díky obsahu cukru ve víně lze zjistit potenciální obsah alkoholu po prokvašení, proto se cukernatost průběžně měří moštoměry nebo optickými přístroji. V našich podmínkách je optimální obsah cukru v moštu asi 11 – 25 kg/100 l [11, 15, 16].

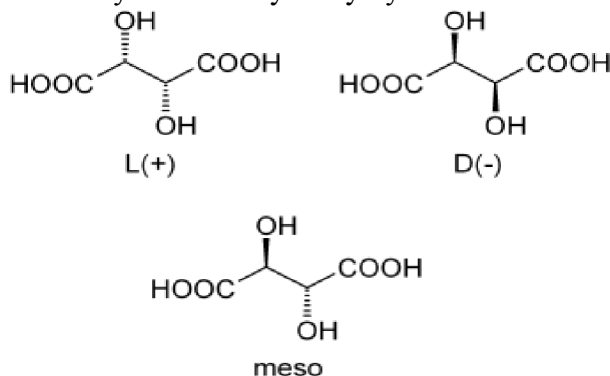


Obrázek 5 Schéma hydrolyzy sacharosy na glukosu a fruktosu [29]

2.6.3 Organické kyseliny

Při rozkladu cukrů vznikají v moštu oxidací převážně kyselina vinná a kyselina jablečná. Dále mohou bobule obsahovat kyselinu jantarovou a malonovou, které se významně podílí na tvorbě aromatických a chuťových látek. Kyselina citronová se v bobulích vyskytuje také, ale ve víně se nenachází, protože se rozkládá při kvašení moštu. Dále se mohou vyskytovat kyselina octová, mléčná nebo máselná, které vznikají působením mikroorganismů. Nejvíce kyselin obsahuje bobule v procesu růstu, měknutím hroznu se obsah a koncentrace titrovatelných kyselin snižuje. Kyseliny ve víně jsou důležité díky svým vlastnostem, které ovlivňují aroma a chuť vína, ale také mohou sloužit jako konzervační činidlo [15].

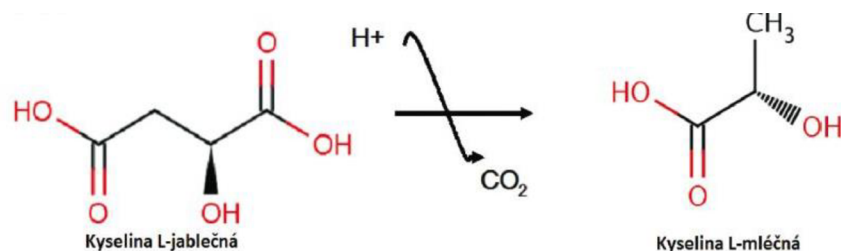
Nejstabilnější a nejsilnější kyselinou je kyselina vinná, její obsah v bobulích se téměř nemění. Tato kyselina se vyskytuje ve třech optických izomerech, a to jako L – kyselina vinná, D – kyselina vinná a kyselina mesovinná (Obrázek 6). S draslíkem a vápníkem tvoří opticky aktivní formy špatně rozpustné soli. Tento fakt se využívá při snižování obsahu kyseliny vinné v moštu. Během kvašení se obsah snižuje vypadáváním tzv. vinného kamene (vinan draselný), který vzniká vysrážením kyseliny hydroxidem draselným.



Obrázek 6 Vzorce optických isomerů kyseliny vinné [43]

Kyselina jablečná je lépe odbouratelná než kyselina vinná, ale vyznačuje se ostřejší a nezralejší kyselou chutí, která je žádoucí u mladých vín. Tato kyselina tvoří s draslíkem a vápníkem lépe rozpustné soli než kyselina vinná, a proto se tímto způsobem její obsah v moštu nesnižuje, protože sůl kyseliny by zůstávala dále v moštu. Snižování obsahu kyseliny jablečné se provádí působením bakterií mléčného kvašení, které rozloží kyselinu jablečnou

na kyselinu mléčnou. Proces tzv. jablečno – mléčného kvašení (Obrázek 7) probíhá až během školení a zrání vína [4, 11, 16].



Obrázek 7 Schéma jablečno – mléčného kvašení [44]

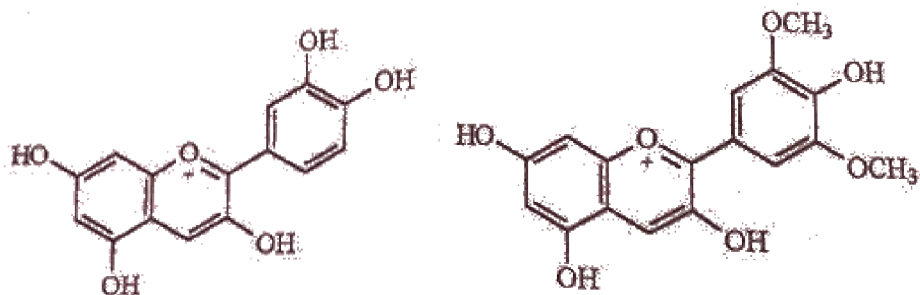
2.6.4 Minerální látky

Minerální látky se do bobulí hroznů dostávají z půdy, a proto je důležitá její kvalita, složení a její vlastnosti. Dalšími faktory, které ovlivňují přísun minerálních látek do révy a poté do moštu jsou klimatické podmínky, odrůda révy, její vlastnosti a požadavky, a také výživa vinice, ve které réva vyrůstá. Nejdůležitější minerální látkou v révě vinné je draslík, v popelu vína ho bývá asi 50 %. Jeho koncentrace v bobulích hroznů se zvyšuje ve fázi dozrávání v souladu s hromaděním sacharidů. Draslík je důležitý hlavně proto, že snižuje obsah kyselin a tedy i pH tím, že tvoří s kyselinou vinnou soli (vinany), které z vína vypadávají jako vinný kámen. Dalšími minerálními látkami jsou hořčík, který negativně ovlivňuje chuť vína svou hořkostí a vápník, který na rozdíl od hořčíku ovlivňuje víno pozitivně, a to především jeho sensorické vlastnosti. Bílá vína obsahují méně minerálních látek než červená, neboť u nich nedochází k nakvášení rmutu jako u vín červených [11, 15, 16].

2.6.5 Fenolické látky

Fenolické látky jsou sloučeniny, které mají ve vinohradnictví a ve vinařství velký význam. Do této skupiny látek patří fenolové kyseliny, flavonoly, anthokyaniny a třísloviny. Tyto látky jsou důležité pro sensorickou kvalitu vína, a to především pro barvu, hořkou chuť a antioxidační vlastnosti např. hydroxyskořicové kyseliny mají vliv na hnědnutí moštů u bílých vín. Obsah těchto látek je u bílých a červených vín rozdílný, představuje je Tabulka 2. Fenolické látky jsou u révy obsaženy především v třapině, slupce, dužnině i v bobulích a semenech. Výskyt fenolických látek je ovlivněn klimatickými a půdními podmínkami regionu, odrůdou nebo agrotechnickými zásahy na vinici [2, 11].

Anthokyaniny (červená barviva) se řadí do jedné z významných skupin fenolických látek, zvýšený obsah nastává od fáze měknutí do fáze zralosti. Jsou to glykosidy různých aglykonů, které se nazývají anthokyanidiny. Jako součást molekul anthokyanů bylo identifikováno pouze 5 sacharidů a to: D – glukosa, L – rhamnosa, D – galaktosa, D – xylosa a L – arabinosa. Do této skupiny patří například kyanidin (fialový) a malvidin (purpurový), Obrázek 8.



Obrázek 8 Strukturní vzorce kyanidinu a malvidinu [36]

Další skupinou fenolických sloučenin jsou **třísloviny (taniny)**. Jsou to deriváty víceatomových fenolů, které tvoří koloidní roztoky. Třísloviny se nacházejí ve slupkách bobulí, třapínách a pecičkách. Na taniny v třapínách se neklade velký důraz, protože se většinou odstraňují již před lisováním. Sensorické vlastnosti tedy téměř neovlivňují, důležitějšími látkami jsou třísloviny ze slupek, peciček nebo dubových sudů, ve kterých se víno skladuje nebo ve kterých zraje. Do této skupiny patří katechin, epikatechin a jejich dimery, trimery nebo oligomery, tzv. proanthokyanidiny, a také sloučeniny, které patří mezi flavan-3-oly. Vědecké studie ukázaly, že antioxidační síla proanthokyanidinů v těle člověka je 20krát vyšší než vitamin E a 50krát větší než vitamin C. Jiné studie ukázaly, že proanthokyanidiny pomáhají chránit lidské tělo před poškozením sluncem, pomáhají zlepšovat vidění a zlepšuje flexibilitu v kloubech a tkáních [15, 16, 26].

Tabulka 2 Obsah jednotlivých skupin fenolických látek v bílých a červených vínech [16]

Skupina fenolických látek	Bílá vína		Červená vína	
	Mladá	Starší	Mladá	Starší
Ne – flavonoidy				
Hydroxyskořicové kyseliny	154	130	165	60
Hydroxybenzoové kyseliny	10	15	60	60
Hydrolyzovatelné taniny (pocházející z dubu)	0	100	0	250
Stilbeny (Resveratrol)	0,5	0,5	7	7
Celkový obsah mg/l	164,5	245,5	232	37
Flavonoidy				
Monomerní flavanoly	25	15	200	100
Proanthokyanidiny a kondenzované taniny	20	25	750	1000
Flavanoly	-	-	100	100
Anthokyaniny	-	-	400	9
Ostatní	-	-	50	75
Celkový obsah mg/l	45	40	1500	1365
Fenoly celkově	209,5	285,5	1732	1742

2.6.6 Aromatické látky

Aromatické látky svým vzájemným působením a vlastnostmi určují celkové aroma vína. Některé odrůdy obsahují pouze několik aromatických látek, zatímco jiné odrůdy obsahují velká množství v určitých poměrech, a tím tvoří typické odrůdové aroma. Množství aromatických látek v odrůdách závisí především na dané odrůdě, ročníku, zralosti, půdě a hnojení vinice. Specifičnost vůní u různých odrůd je dána tím, že se aromatické látky vytváří na vnitřní straně slupky a tam jsou geneticky zakódovány, např. Tramín připomíná svým aroma těžké růže, Muškát muškátový ořech.

Z chemického hlediska jsou aromatické látky svou strukturou podobné éterickým olejům, jsou to směsi alifatických a aromatických alkoholů, esterů, acetaldehydů, mastných kyselin, dusíkatých sloučenin, thiolů a heterocyklických sloučenin. Tyto látky se dělí do dvou kategorií a to podle toho, ve které fázi se víno nachází [2, 9].

Primární aromatické látky charakterizuje především aroma bobulí, které se po procesu zpracovávání dostává do moštu a vína. Do této skupiny patří aromatické látky ve volné a vázané formě, obě skupiny jsou typické pro určité odrůdy vína. Aromatické látky ve volné formě lze senzorycky ohodnotit již při průběhu zrání přímo na vinici, protože při procesu kvašení unikají nebo se přeměňují na sekundární aromatické látky. Přeměna látek může probíhat také vlivem působení ušlechtilé plísně *Botrytis cineria*, ale také negativním napadením bakteriemi a plísněmi. Profil vína vytvářejí především aromatické látky ve vázané formě, které se uvolňují až při nakvácení moštu mladého vína, protože se tvoří díky činnosti kvasinek a enzymů.

Sekundární aromata vznikají především během kvašení, školení nebo zrání vína. Dále se aromatické látky dělí do několika základních skupin: monoterpeny, norisoprenoidy, methoxy-pyraziny a těkavé fenoly.

- **Monoterpeny** – tyto látky jsou charakteristické pro muškátové odrůdy, a to například Muškát moravský, Muškát Ottonel nebo Tramín. Jejich aroma připomíná muškátový ořech a květiny.
- **Norisoprenoidy** – vznikají díky obsahu karotenoidů, které jsou obsaženy v dužnině bobulí, ale především v jejich slupce. Obsah norisoprenoidů se zvyšuje postupným odbouráváním karotenoidů, kterých při fázi dozrávání ubývá. Charakteristickou odrůdou pro tyto látky je Chardonnay, které voní po tropickém ovoci a květech díky norisoprenoidu β – damascenon.
- **Methoxy-pyraziny** – jsou charakteristické pro odrůdu Sauvignon a Cabernet Sauvignon. Nejvýznamnějším zástupcem je isobutylpyrazin, který má specifické travnaté aroma. Obsah těchto látek je nejvyšší v zelených bobulích, zráním dochází ke snižování obsahu.
- **Těkavé fenoly** – většinou poškozují kvalitu a aroma vína. Obsah fenolů v bobulích závisí na odrůdě, počasí nebo agrotechnických zásadách na vinici. Obsah fenolů u bílých odrůd lze zjistit již na vinici, a to hnědým zbarvením bobule, které po zpracování vína způsobí hořkou chuť a nepříjemné aroma [11, 15, 16].

2.6.7 Dusíkaté látky

Do skupiny dusíkatých látek patří především aminokyseliny, peptidy, bílkoviny, vitaminy, amonné soli, aminy a dusičnany, které se v hroznech vyskytují v minerální nebo organické formě. Vyšší obsah těchto látek mají jakostní odrůdy révy než odrůdy méně jakostní. Během kvasného procesu se obsah dusíkatých látek snižuje z toho důvodu, že slouží

jako potrava pro kvasinky, avšak k závěru kvašení se koncentrace opět zvyšuje, a to především obsah aminokyselin, které vznikají autolýzou kvasinek. Dvacet různých aminokyselin ve víně se podílí na vytváření chuťových a aromatických látek. Pozitivní vliv na sensorický profil vína mají především arginin, fenylalanin a tyrosin, zatímco negativní vliv mají methionin, threonin a leucin. Aminokyseliny jsou důležité jako zdroj pro potraviny pro kvasinky, ale také pro bakterie mléčného kvašení, které jsou důležité při snižování obsahu kyseliny mléčné při jablečno – mléčném kvašení. Bílkoviny slouží jako stabilizátor vína a moštu [2, 11, 15, 16].

2.6.8 Enzymy

Tyto látky jsou pro vinařskou technologii velmi důležité, jsou to biokatalyzátory životní činnosti buněk, které urychlují základní biochemické pochody. Z chemického hlediska jsou to vysokomolekulární bílkovinné látky koloidní povahy. Pro použití ve vinařství je důležité znát vlastnosti, povahu a působení enzymů a až tehdy se mohou vhodně kombinovat. Každá chemická reakce, která v bobulích hroznů probíhá, je zapříčiněna specificky daným enzymem. Enzymatické preparáty se používají především pro zlepšení vlastností vína např. zlepšení výlisnosti hroznů, zlepšení odkalení, filtrace a stabilizace vína nebo extrakce a stabilizace barviv a aromatických látek [11].

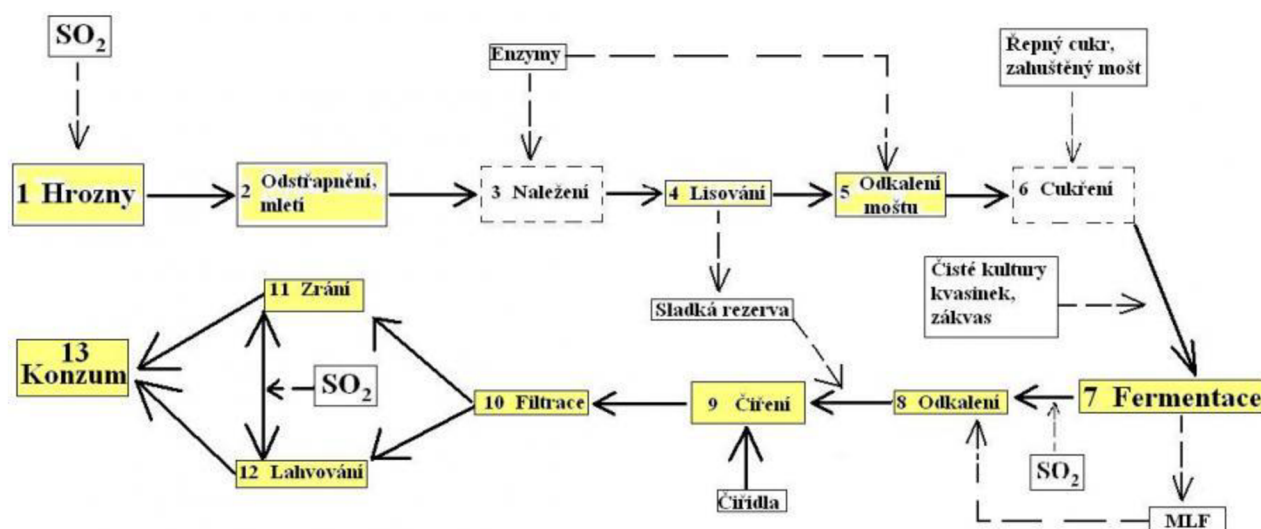
V bobulích hroznů se setkáváme s velkou různorodostí enzymů, ale působí zde především oxidační enzymy (oxidáza, polyfenoloxidáza, peroxidáza, alkoholdehydrogenáza, askorbináza atd.). Tyto enzymy způsobují hnědnutí mladých vín, proto se vína upravují sířením, aby se zastavilo přenášení kyslíku a následná nežádoucí oxidace vína. Dalšími důležitými zástupci enzymů jsou pektinázy, glykosidázy, glukanázy a proteázy.

Pektolytické enzymy (pektolázy) jsou důležité při enzymatickém štěpení pektinů, které jsou obsaženy v dužnině a slupce bobulí. Používají se především pro lepší vyčíření a odkalení moštu před procesem kvašení nebo pro lepší uvolnění barviv a aromatických látek do vína. Pektinázy nejsou závislé na pH moštu, avšak teplota by pro správnou činnost enzymů měla být 20 – 30 °C. Přidávání pektináz do moštů by mělo být správně načasované, aby byla dosažena požadovaná kvalita vína. Pektinázy se mohou aplikovat ve čtyřech případech: před lisováním, v průběhu macerace hroznů, před macerací na rmut a po vylisování moštů.

Glykosidázy – tato skupina enzymů napomáhá uvolňování aromatických látek (glykosidů) z pevných částí bobulí. Tento proces může probíhat i s pomocí vinných kvasinek, které jsou většinou v moštu obsaženy v nízkých koncentracích, a proto se využívá spíše komerčně vyrobených enzymů s vysokou aktivitou β -D-glukosidázy, která výrazně přispívá k tvorbě aroma během procesu výroby vína [11, 16, 17].

2.7 Technologie výroby vína

V celosvětovém měřítku v produkci vína převažuje výroba vína z bílých odrůd, a to cca v 85 %. V České republice podíl bílých odrůd převažuje také nad modrými odrůdami, jednak kvůli větší ploše osázení bílými odrůdami, ale také proto, že bílé hrozny zde lépe dozrávají. Z těchto bílých odrůd se vyrábí především výběrová, odrůdová, typová a značková vína. V příznivých ročnicích se vyrábí právě vína výběrová, která mají své typické charakteristické vlastnosti a musí je uznat odborná, výběrová komise. Odrůdová vína jsou typická svou jednotnou čistou odrůdou hroznů, která musí být obsažena minimálně v 75 %. Typová vína mají své charakteristické vlastnosti, chuť a aroma díky lokalitě nebo půdě, ve které vyrůstají a značková vína jsou označena značkou vinařského závodu, kde se vyrábí a jsou velmi kvalitní. Technologie výroby vína probíhá v několika fázích, které znázorňuje Obrázek 9 [4, 12, 16].

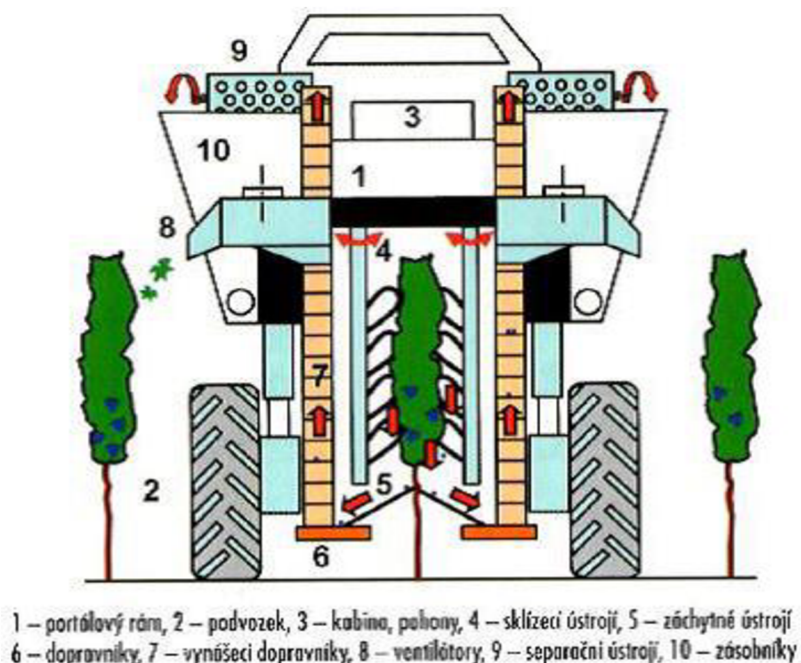


Obrázek 9 Schéma technologie výroby vína [40]

2.7.1 Vinobraní

Sklizeň hroznů se většinou zdá jako jednoduchý krok v technologii výroby vína, avšak opak bývá pravdou. Zrání hroznů se musí sledovat minimálně několik týdnů před sklizní, aby se hrozny sklízely pokud možno v tzv. konzumní zralosti. Dokonalá zralost totiž zajišťuje potřebné předpoklady k dobré kvalitě produkovaného vína, a to díky vysoké cukernatosti a přiměřenému množství kyselin, které jsou velmi důležité pro vinařskou technologii. Tyto faktory se sledují během zrání předběžnými zkouškami. Dalšími faktory, které se před sklizní sledují, jsou zdravotní stav hroznů, třísloviny nebo barva. Pokud nejsou bobule dostatečně vyzrálé, produkované víno má drsnou, kyselou chuť, zatímco přezrálé hrozny, které sice mají nejvyšší cukernatost, ale minimální nebo žádný obsah kyselin, mají zcela neharmonickou chuť vína. Hrozny by se měly sklízet za teplého a suchého počasí, aby nedošlo k naředění vodou. V našich klimatických a zeměpisných podmínkách dozrávají bobule na přelomu září a října, kdy také probíhá sklizeň. Sbírají se většinou všechny odrůdy, kromě hroznů určených pro produkci vín s přívlastkem (ledová vína, pozdní sběr). Hrozny určené k výrobě vína musí být čisté, zdravé, nezapařené, musí se sbírat podle jednotlivých odrůd a také podle barev, bílé (růžové, červené) pro výrobu bílého vína a modré pro výrobu vína červeného. Hrozny, které jsou napadeny nějakou chorobou, se musí sbírat odděleně [12].

Sklizeň hroznů se může provádět dvěma způsoby, buď ručně, nebo mechanickým způsobem (Obrázek 10). Ruční sklizeň je stále nejběžnějším a nejšetrnějším způsobem sběru vína. V některých oblastech jako např. v Champagni se používá pouze ruční sběr hroznů, protože hrozny se musí dopravit z vinice nepoškozené a nepopraskané. Další výhodou ručního sběru je protřídění bobulí přímo na vinici, tím pádem se do výroby nedostanou shnilé hrozny nebo hrozny, které jsou napadeny plísní. Při ruční sklizni se hrozny z keřů odřezávají nožem nebo odstřihávají nůžkami a ukládají se do plastových nebo smaltovaných nádob. Hrozny nikdy nesmí přijít do styku se železem, vhodné nejsou ani měděné nebo plechové nádoby.



Obrázek 10 Schéma mechanického sklízecího hroznů [41]

Mechanizovaná sklizeň se uskutečňuje pomocí sklízecích (Obrázek 11) a má své výhody i nevýhody. Tato metoda sklizení je velmi oblíbená především v Austrálii, kde se hrozny sklízí v noci při nízké teplotě. Mechanizovaná sklizeň je velmi rychlá a levná, avšak dochází při ní k výraznému porušení a popraskání bobulí hroznů. Další nevýhodou je fakt, že se sklízecí nedají použít na všechny vinice (vinice na strmých svazích) nebo odrůdy (botrytická vína) [2, 10].



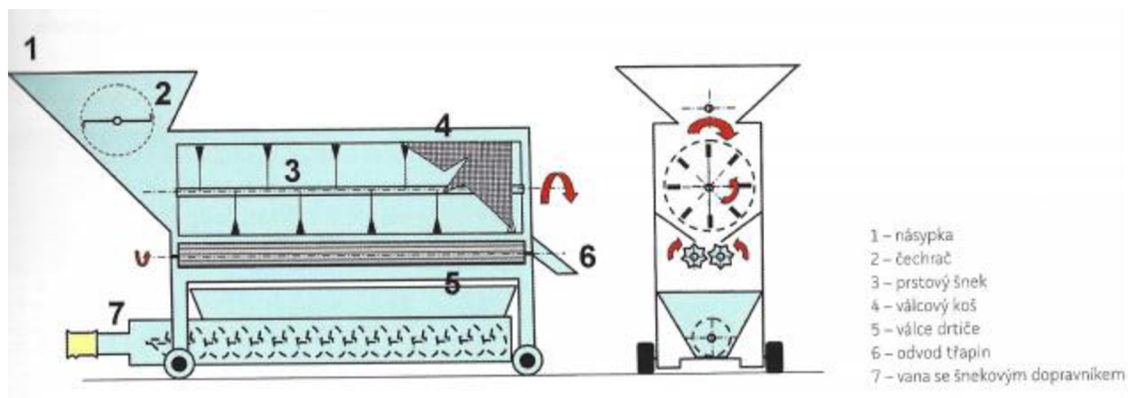
Obrázek 11 Fotografie mechanického sklizeče [41]

2.7.2 Přejímka a zpracování hroznů

Sklizené hrozny z vinice se do výroben dopravují v nejrůznějších bednách, kádích, návěsech, kontejnerech atd. nepopraskané nebo nepomačkané, aby se nekontaminovaly škodlivými bakteriemi. Správně by se měly hrozny zpracovat tentýž den, ve kterém se sbírají, aby nedošlo k zapaření nebo naoctění. Pokud tato podmínka nemůže být z nějakého důvodu splněna, hrozny se umístí do chladu a posypou se pyrosiřičitanem draselným nebo sodným v dávce 10 – 15 g/100 kg a zpracují se co nejdříve. Při přejímce hroznů by se měl zvolit co nejšetrnější postup, aby nedošlo k porušení bobulí (samospád, pásový dopravník, hadice, potrubí). Před zpracováním hroznů se zjišťuje hmotnost hroznů pro výpočet výlisnosti a výnosu jednotlivých odrůd, zdravotní stav bobulí a cukernatost, která se měří speciálními moštoměry. Cukernatost se v České republice udává v °NM (normalizovaný moštoměr), tato hodnota udává, kolik kilogramů cukru je obsaženo ve sto litrech moštu. Údaje o cukernatosti se liší převážně ročníkem, termínem sklizně nebo odrůdou. Další možností pro měření cukernatosti jsou refraktometry [2, 10, 12].

2.7.2.1 Mlýnkování

Je to proces, při kterém se do drtiče (mlýnku) dopravují celé hrozny rovnou z přejímky a dochází zde k rozdrčení bobulí i s třapinami. Vzniklý produkt se nazývá rmut, který se poté důkladně provzdušňuje a jeho výtěžnost je závislá na kvalitě rozdrčených bobulí. Provzdušňování je důležité pro podporu růstu kvasinek, především v počáteční fázi kvašení. Mlýnek, který narušuje strukturu bobulí, musí být nastaven tak, aby nerozmačkal i třapiny a semena, ale pouze dužninu bobule. Pokud by totiž došlo k rozdrčení třapin a semen, tak by se do moštu dostalo velké množství chlorofylu a tříslovin, které by v budoucím víně vytvořily trpkou nebo travnatou nežádoucí příchuť. Mlýnkování se může provádět různými typy mlýnků – válcové, bubnové, kladívkové nebo odstředivé nebo mlýnkoodstopkovačů (Obrázek 12) [9, 11, 16].



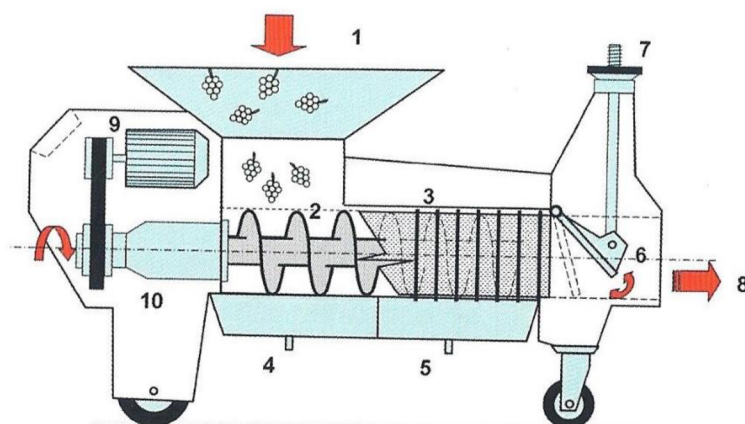
Obrázek 12 Schéma činnosti mlýnkoodstopkovače [20]

2.7.2.2 Odzrňování

Odzrňování je důležitým krokem při procesu výroby bílého vína. Dochází zde k odstraňování třapin ze rmutu. Drť padá z mlýnku do podstavné nádoby (kádě) nebo přímo do odzrňovače, kde se pomocí lopatek rmut vystírá na síto bubnu, díky kterému se hrozny odtrhávají a propadávají do připravené nádoby, zatímco třapiny vypadávají ven na konci zařízení. Vína, která jsou vyrobena z odzrňovaných hroznů, mají příjemnější chuť a jemnější charakter než vína z hroznů neodzrňovaných. Rozdílem v technologii výroby červeného a bílého vína je právě tato fáze odzrňování rmutu, neboť při výrobě vína červeného se rmut neodzrňuje, ale dochází k jeho nakvášení, při kterém se tvoří typické sensorické vlastnosti a také potřebné vyloučení barviv. Většinou se modré odrůdy nechají nakvášet 4 – 14 dní při 20 – 25 °C, podle požadovaných vlastností budoucího vína [2, 18, 23].

2.7.2.3 Lisování

Lisováním hroznů dochází k oddělení moštu od tzv. matolin, ty představují tuhé složky bobulí, které byly obsaženy ve rmutu. Nejvyšší a nejjemnější víno je scezený rmut bez lisování tzv. samotok. Tento podíl obsahuje nejvíce cukru a kyselin a jeho výtěžek je asi 60 %. První a druhé lisování je bohaté především na extrakční látky a výtěžek se pohybuje mezi 10 – 25 %. Pokud se provádí třetí lisování (5 %) mošt obsahuje velké množství tříslovin, které ve víně nejsou příliš žádoucí. Ze 100 kg hroznů se většinou získá asi 75 l moštu. Tento údaj je pouze orientační, neboť výtěžnost je závislá především na odrůdě bobulí (kvalitnější odrůdy mají menší výtěžnost), stupněm zralosti, způsobem zpracování před lisováním, tloušťce lisované vrstvy nebo počtem opakovaní lisování. Pro lisování se používá nejrozličnějších lisů, a to například šroubové, kontinuální, hydraulické, pneumatické nebo šnekové lisy (Obrázek 13) [19, 20, 23].



1 – násypka, 2 – lisovací šnek, 3 – lisovací koš s kruhovými výztužemi
 4 – odvod samotoku, 5 – odvod dolisku, 6 – přitlačné víko
 7 – regulace lisovacího tlaku, 8 – odvod matolin
 9 – elektromotor, 10 – převodovka

Obrázek 13 Schéma činnosti šnekového lisu [21]

2.7.3 Úprava moštu pro kvašení

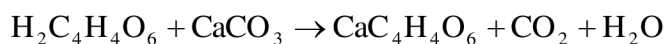
Tyto úpravy se provádějí hlavně z toho důvodu, aby mošt určený pro kvašení byl natolik kvalitní, aby byl zaručen bezproblémový kvasný proces. Většinou se provádí úpravy cukernatosti a kyselosti, odkalování nebo síření moštu [2].

2.7.3.1 Odkalování moštu

Proces odkalování slouží k odstranění nečistot z moštu. Tyto nečistoty pochází již z vinice z nejrůznějších hnojiv, které byly na vinici používány, popílku a prachu nebo při drcení a jiných technologických procesech, při kterých se do moštu dostávají další nečistoty obsahující nežádoucí škodlivé mikroorganismy. Kaly ve víně vznikají usazováním těchto nečistot a strhávají s sebou i jiné nežádoucí látky (těžké kovy, slizové látky, rezidua pesticidů atd.) [19, 23].

2.7.3.2 Úprava kyselosti

Úprava kyselosti se používá především u vín, které byly vyrobeny z nevyzrálých hroznů a mají tvrdou a kyselou chuť. Pokud se ale rozbořem moštu zjistí příliš vysoký obsah titrovatelných kyselin, může se přistoupit k chemickému odbourání těchto kyselin, protože v takových případech nelze odbourat takové množství biologickou cestou (jablečno – mléčné kvašení). Pro chemické odbourávání kyselin se používá uhličitan vápenatý, který tvoří s kyselinou vinnou nerozpustnou sůl vinan vápenatý podle rovnice:



Tato metoda je zatím nejlevnějším a nejčastějším způsobem, který se využívá k odbourávání kyselin, avšak používá se hlavně ke snížení obsahu kyseliny vinné, protože s kyselinou jablečnou tvoří uhličitan vápenatý rozpustnou sůl jablečnan vápenatý, která se vysráží pouze částečně. Snížování kyselosti se musí provádět pouze mírným způsobem asi o 0,5 – 2 g/l, aby nedošlo ke znehodnocení chuti a vlastností výsledného vína. Na snížení veškerých kyselin o 1 g/l se spotřebuje asi 67 g uhličitanu vápenatého na 100 l moštu [11, 19, 23].

2.7.3.3 Úprava cukernatosti

V některých ročnících mají hrozny příliš málo cukru, proto se mošty mohou podle Zákona o vinohradnictví a vinařství 321/2004 Sb. v aktuálním znění, přislazovat (Tabulka 3). Pro tyto účely se používá rafinovaný řepný cukr (sacharóza). Pokud chceme zvýšit cukernatost moštu o 1 °ČNM musíme přidat 1,1 kg cukru do 100 l moštu. Přicukřování, neboli chaptalizace, je povolena pouze u stolních a jakostních vín, u vín s přívlastkem platí přísný zákaz. Státní zemědělská a potravinářská inspekce udává, že ve vinařské zóně A (oblast Čechy) lze zvyšovat obsah alkoholu maximálně o 3 % obj., to znamená, že cukernatost moštů a rmutů se může zvýšit maximálně o 5 °NM. Ve vinařské zóně B (oblast Morava) lze zvyšovat obsah přirozeného alkoholu maximálně o 2 % obj. a cukernatost moštů a rmutů se může zvýšit maximálně o 3,4 °NM [9, 19, 23].

Tabulka 3 Maximální limity pro zvyšování přirozeného alkoholu platné od roku 2011[42]

ČECHY			
	Vína bez CHOP/CHZO* a vína s CHZO (dříve „stolní“ a zemská vína)	Vína s CHOP (jakostní odrůdová nebo známková vína)	
	bílé a růžové	červené	bílé, růžové i červené
max. alkohol ve víně (% obj.)	11,5	12,0	15
max. cukernatost upraveného moštu (°NM)	19,3	20,2	25,2
MORAVA			
	Vína bez CHOP/CHZO* a vína s CHZO (dříve „stolní“ a zemská vína)	Vína s CHOP (jakostní odrůdová nebo známková vína)	
	12,0	12,5	15
max. alkohol ve víně (% obj.)	12,0	12,5	15
max. cukernatost upraveného moštu (°NM)	20,2	21,0	25,2

* CHOP – chráněné označení původu, CHOZ – chráněné zeměpisné označení [28]

2.7.3.4 Síření

Oxid siřičitý (SO₂) se do moštu přidává proto, že slouží jako redukční a antiseptické činidlo. Váže na sebe molekuly kyslíku, které způsobují oxidaci vína a také acetaldehyd, který negativně ovlivňuje sensorické vlastnosti vína a způsobuje jeho zvětralou chuť. Množství SO₂ potřebného k síření se dělí do tří kategorií: slabé, střední, silné až velmi silné. U zdravých rmutů se přidává 10 – 30 mg/l SO₂, tato dávka postačuje k inaktivaci oxidačních enzymů ve rmutu. Slabé síření také podporuje stimulaci kvasinek. Dávka 50 – 80 mg/l se naopak používá k brzdění rozvoje kvasinek a mléčných bakterií kvůli odkalování moštů, a také se podílí na ochraně před kvasničnými kaly při stáčení vína. Silné a velmi silné síření slouží k zabránění rozvoje nežádoucích bakterií a plísní v moštu, které ho kontaminují. V tomto případě je nutná dávka SO₂ 100 – 150 mg/l. Tento způsob síření se používá při odkalování moštů a rmutů z nahnilých nebo naplesnivělých hroznů [4, 11].

2.8 Kvašení moštu

Kvašení moštu neboli alkoholová fermentace, je biochemický proces, při kterém se jednoduché cukry (glukóza, fruktóza) obsažené v moštu rozkládají na ethanol a oxid uhličitý, díky vinným kvasinkám. Oxid uhličitý je velmi nebezpečný, protože je lehčí než vzduch a tím pádem je schopný zaplňovat sklepy, ve kterých je potom nedýchatelné prostředí, proto se musí kvašení pozorně hlídat, aby nedošlo ke smrtelným nehodám. Ethanol je jednou z nejdůležitějších složek vína a ovlivňuje jeho sensorické vlastnosti, avšak nad 13 % působí agresivně a pálí v ústech. Další výhodou obsahu ethanolu jsou jeho konzervační vlastnosti. Při fermentaci vznikají jako vedlejší produkty glycerol, kyselina mléčná, kyselina octová, vyšší alkoholy a methanol, který vzniká rozkladem pektinů. Alkoholovou fermentaci lze provádět dvěma způsoby: spontánní nebo řízenou fermentací [9, 16, 23].

Spontánní kvašení patří mezi tradiční technologie výroby vína. Vína vyrobená touto technologií mají specifické aroma a chuť, ale vyžadují delší čas na výrobu a důležité je také kvalitní dozrání hroznů. V tomto způsobu kvašení se musí dbát na důslednou kontrolu obsahu oxidu siřičitého, aby se minimalizoval růst populací různých bakterií. Pokud jsou hrozny zdravé, dávka oxidu siřičitého se ani přidávat nemusí. Maximální dávkou pro jednorázové přidání SO₂ je asi 50 mg/l. Bobule pro spontánní kvašení musí být zdravé (může se vyskytovat ušlechtilá šedá hniloba), vyztřelé a měly by se sklízet při nízkých teplotách. Technologické procesy (odstopkování, drcení, mletí, lisování) se musí provádět co nejšetrnějším způsobem. Při odkalování se odstraňuje pouze hrubý kal, neboť menší kalové částice obsahují velké množství kvasinek. Spontánní kvašení nastává po úpravě cukernatosti nejlépe ve vinném sklepě a musí se důkladně kontrolovat kvůli chorobám nebo vadám ve víně. Teplota moštu by se měla pohybovat mezi 15 – 18 °C, kvašení může probíhat až měsíc. Po prokvašení moštu se víno stočí z kalu, u pozdních sběrů se mošt nechá prokvasit tzv. do sucha [9, 23].

Řízené kvašení se od spontánního liší vinnými kvasinkami, které se k němu využívají. Výrobce vína si v dnešní době může vybrat z nepřeberných druhů kvasinek například:

- kvasinky, které zvýrazní charakter odrůdy (Ryzlink rýnský, Sauvignon)
- kvasinky určené pro aromatické odrůdy
- kvasinky pro plná vína.

Teplota pro řízené kvašení moštu nesmí přesáhnout 25 °C, protože jinak by byl průběh kvašení příliš rychlý nebo může docházet ke ztrátám obsaženého alkoholu a aromatických látek. Optimální podmínky řízeného kvašení jsou důležitým faktorem pro výrobu kvalitního vína. Před začátkem kvašení by teplota měla být asi 15 – 18 °C (2 – 3 dny), během kvašení by se měla pohybovat mezi 20 – 22 °C, v této fázi dochází k tzv. bouřlivému kvašení, při kterém vzniká CO₂ a teplo. Tato fáze trvá několik dnů až týdnů. Obecně platí, že mošty, které mají nižší obsah cukru, kvasí lépe než mošty s vysokým obsahem cukru (výběr z bobulí). Ve chvíli, kdy je prokvašena asi polovina přítomných cukrů (4 – 5 % obj. alkoholu) a probíhá rozmnožování kvasinek, vzniká burčák. Po bouřlivém kvašení nastává fáze dokvašení, kdy vzniká mladé víno, které je velmi kyselé díky rozpuštěnému CO₂. V této fázi produkce CO₂ ustává a víno je velmi citlivé na oxidaci, proto se musí nádoby neustále dolévat, aby bylo zabráněno přístupu vzduchu. Při prvním stáčení vína dochází k odstraňování kvasničních kalů, které vznikají usazováním živých i odumřelých kvasinek. Kvasinky sedimentují na dno, protože cukr, který pro ně byl zdrojem živin, je spotřebován a ethanol je pro kvasinky smrtící [9, 16].

2.9 Zrání vína

Zrání vína probíhá na jemných kvasničných kalech, které mají reduktivní vlastnosti a jsou důležité v dlouhodobém procesu zrání vína. Kvasničné kaly vínu dodávají specifické organoleptické, fyzikální a chemické vlastnosti a chrání víno před předčasným stárnutím. Nejefektivnějším způsobem zrání na kalech je zrání v dřevěných sudech, v tancích nebo v demižonech. Nádoby, ve kterých víno zraje, mají na výslednou kvalitu velký vliv. Při zrání vína je velmi důležité promíchávat kal a to nejlépe v týdenních intervalech po dobu 6 měsíců až jednoho roku, aby nedocházelo ke tvorbě sirnatých sloučenin nebo k nežádoucí oxidaci. Délka zrání je individuální podle odrůdy vína [9, 16].

2.10 Školení vína

Je soubor operací, které urychlují usazování kalových částic, odstraňují nežádoucí látky a obecně zlepšují vlastnosti a kvalitu vína. K nejdůležitějším operacím patří síření, číření a filtrace vína [9].

2.10.1 Síření vína

Síření je jedním z povolených způsobů konzervování vína, jehož účinnou látkou je oxid siřičitý (SO_2). Ten omezuje činnost mikroorganismů a chrání víno před oxidací a předčasným stárnutím. K síření sudů před naplněním se používají sirné plátky, k síření vína potom disiřičitan draselný, ale používanější je komprimovaný SO_2 , kterým lze sířit jak sudy, ale rovněž i víno v sudech [11, 23].

2.10.2 Číření vína

Číření vína se provádí zejména z toho důvodu, aby nedocházelo k budoucímu znehodnocení a zhoršení kvality. K této operaci dochází mezi prvním a druhým stáčením vína nejrůznějšími druhy čířidel, které sráží nežádoucí látky ve víně. Srážení a následné usazování probíhá při teplotě do 25 °C, 2 – 3 týdny. Číření zajišťuje čistotu a čirost výsledného vína, kterou spotřebitelé vyžadují.

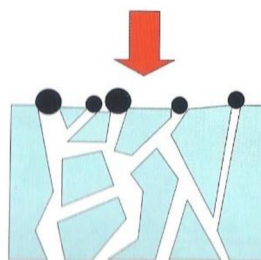
Čířidla se dělí do tří základních skupin:

- čířidla založená na adsorpci – aktivní uhlí, kyanoželeznatan draselný
- čířidla s kladným nábojem – vaječný bílek, želatina
- čířidla se záporným nábojem – tanin, agar, bentonit, kaolin [23]

2.10.3 Filtrace vína

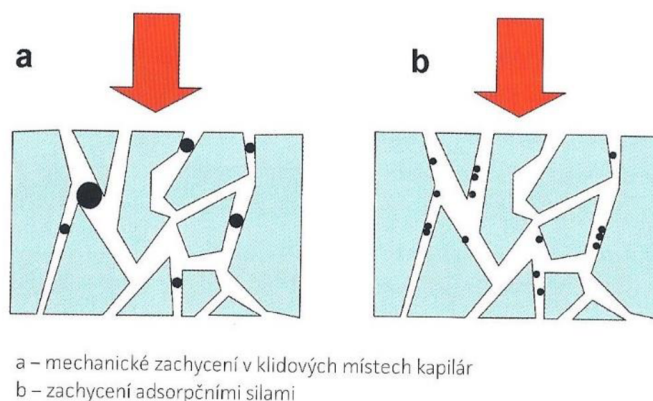
Filtrace vína je metoda, která se používá k oddělování pevných částic (kaly, mikroorganismy) z roztoku, a to takovým způsobem, aby nedošlo k chemickým nebo organoleptickým změnám ve výsledném víně. Účinnost filtrace závisí na filtračním materiálu, velikosti pórů nebo na počtu opakování filtračního procesu. Filtrovat se mohou mošty, mladá vína, ale především vína před lahvováním, aby bylo docíleno mikrobiologické stability a jiskrnosti vína. Filtrace může být provedena několika způsoby, a to například:

- křemelinová filtrace – je vhodná pro zakalené mošty a mladá vína. Tato metoda využívá principu povrchové filtrace (Obrázek 14), při které jsou kalové částice větší než póry filtračního materiálu a proto ulpívají na povrchu [20].



Obrázek 14 Schéma principu povrchové filtrace [20]

- desková filtrace – je nejrozšířenější metodou u nás, deskové filtry se vyrábějí v mnoha různých velikostech především pro hrubou, jemnou a sterilní filtraci. Desková filtrace je hloubková metoda (Obrázek 15), při které lze zachytit kalové částice, které jsou menší než póry pomocí klidových míst v kapilárách nebo vlivem adsorpčních sil na povrchu filtrační hmoty.



Obrázek 15 Schéma principů hloubkové filtrace [20]

- membránová filtrace – patří mezi nejkvalitnější filtrační metody a provádí se těsně před lahvováním vína. Velikost pórů se pohybuje od 0,45 μm do 1,2 μm , což dostačuje pro požadovanou sterilitu vína. Touto metodou lze uskutečnit také mikrofiltraci nebo ultrafiltraci [9, 16, 21].

2.11 Vinné kvasinky

Kvasinky jsou jednobuněčné organismy, které tvoří oválné nebo kulaté buňky. Jejich rozmnožování probíhá především pučením, kdy z jedné mateřské buňky vyroste stejně velká buňka dceřinná. Nejrozšířenějším druhem kvasinek je *Saccharomyces cerevisiae*, která se používá kromě vinařství i pro výrobu piva, ethanolu nebo droždí. Rod *Saccharomyces* zavedl v roce 1838 Meyen. Kvasinky zkvašující ovocné mošty poté později v roce 1870 definoval Rees a nazval je *Saccharomyces ellipsoideus*, dnes se používá název *Saccharomyces vini*.

Vinařské kmeny kvasinek mošt prokvašují při 25 °C po dobu 7 – 14 dnů, obsah ethanolu se zvyšuje pomaleji než u jiných fermentačních výrob. Vinné kvasinky musí mít větší toleranci vůči etanolu (u šampaňských vín až 8 – 12 %) a SO_2 , kterým se ošetřují mošty. Lze je rozdělit do dvou kategorií na kulturní (exogenní) a přírodní (apikulátní) [11, 13].

Kulturní kvasinky jsou kmeny přírodních vinných kvasinek, které byly vyšlechtěny v laboratoři. Vinaři je používají proto, že jsou spolehlivější než kvasinky apikulátní, a také

z důvodu, že odolávají vyšším hladinám alkoholu. Přírodní kvasinky jsou obsaženy na povrchu slupek zralých hroznů. Tento kvasinkový povlak obsahuje i jiné mikroorganismy, ale při dozrání hroznů obsahuje asi 10 milionů kvasinkových buněk, asi 100 000 z nich jsou vinné kvasinky. Tyto kvasinky zahajují kvašení a vytváří specifické vůně ve víně. Jejich nevýhodou je jejich nízká tolerance k ethanolu, proto se v další fázi kvašení přidávají kvasinky kulturní [19, 27].

2.12 Vady vína

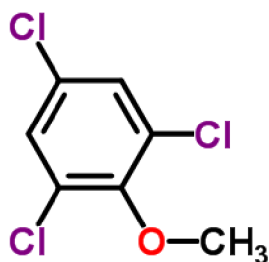
Způsobují je látky, které se do vína dostávají špatnou manipulací s vínem, nevhodným zpracováním hroznů, kvašením, zráním nebo nedostatečnou hygienou v prostředí výroby. Tyto vady negativně ovlivňují výsledné senzorycké vlastnosti vína (chuť, aroma, vzhled). Mezi běžné vady, které mohou vzniknout neodborným podáváním vína, jsou krystalky připomínající cukr, ale ve skutečnosti je to zbytek vinného kamene, kousky korku z nevhodně otevřeného vína nebo bublinky v bílém víně, které jsou způsobeny oxidem uhličitým [10, 16].

2.12.1 Pachut' po plísniích

Tato vada je způsobena již počátečním zdravotním stavem hroznů na vinici při vinobraní. Z pohledu kvality jsou neškodlivější hrozny, které jsou napadeny padlí révovou nebo hnilobou (šedá hniloba, *Penicillium*, *Aspergillus*). Jsou to nejčastější houbové choroby u révy vinné, které negativně ovlivňují kvalitu vína. Šedá hniloba je spojena s výskytem enzymu lakáza, který způsobuje změny barviv a fenolických látek, a proto u těchto napadených vín dochází k hnědnutí. Mírnou pachut' po plísniích a hnědnutí lze odstranit čířením vína zdravými kvasnicemi, silnější pachut' kaseinem nebo aktivním uhlím [16, 23].

2.12.2 Pachut' po korku

Korkové zátky, které jsou v dnešní době velmi oblíbené, mají tu nevýhodu, že obsahují aromatické látky, které se mohou do vína uvolňovat po lahvování. Původcem této pachuti je 2,4,6 – trichloranisol (TCA), (Obrázek 16), ten dává vínu plesnivý, zatuchlý zápach, který se přístupem vzduchu ještě zesiluje. Pachut' po korku vzniká při látkové výměně plísni, které nebyly usmrceny při dezinfekci kůry, ze které byla korková zátka vyrobena [16, 19, 23].



Obrázek 16 Vzorec 2,4,6-trichloranisolu [45]

2.12.3 Pachut' po třapinách

Vzniká při procesu zpracování hroznů, kdy se bobule pouze rozdrtí bez použití mlýnkoodzrňovače a následně se vylisují použitím vysokého tlaku. Tímto způsobem zpracování dochází k uvolňování látek z třapiny, které mají hořkou, trpkou nebo bylinnou chuť. Hořkou pachut' ve víně způsobují také fenolické látky, které jsou obsaženy ve slupkách a semenech dostatečně nevyzrálých hroznů [16].

2.12.4 Reduktivní aroma – sirka

Způsobují ho nízkomolekulární sirtaté látky, které ve víně a moštu vznikají ve stresových podmínkách při nedostatečné výživě kvasinek nebo přidáváním vysokých dávek oxidu siřičitého. Nejrozšířenější látkou, která způsobuje reduktivní aroma je sirovodík H₂S, který patří mezi velmi těkavé thioly a svým aroma připomíná „zkažená vejce“. Sirovodík, který se vytváří na začátku kvašení uniká z kvasícího materiálu s CO₂, avšak na konci kvašení, kdy tvorba CO₂ ustává se usazuje ve víně nebo v kalech a je nutné ho odstranit přípravky na bázi mědi [10, 16].

2.12.5 Křísovatění

Křísovatění způsobuje několik druhů kožkotvorných kvasinek (*Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Debaryomyces*), které vytvářejí na povrchu vína bílý, sametový povlak, který se zpočátku vytváří pouze malou skupinkou kvasinek, ale postupně se rozrůstá a sílí. Této vadě se dá předejít důkladnou ochranou vína před oxidací, udržováním teploty do 20 °C, dodržováním obsahu volného oxidu siřičitého a dostatečné plnosti nádob [9, 16].

2.12.6 Myšina

Myšina velmi silně ovlivňuje aromatické a chuťové vlastnosti vína, avšak nezkušený konzument tuto vadu nemusí vůbec rozpoznat. Typickým projevem myšiny je zápach „myší moči“ nebo zatuchlé nevětrané místnosti. Tento projev se dá lehce zjistit nakapáním několika kapek vína na dlaň a poté jejich vypařením. Myšina ve víně je způsobena především mléčnými bakteriemi – *Lactobacillus* a *Oenococcus*, případně *Brettanomyces* v chladnějších oblastech. Pokud je tato vada ve víně rozšířena, nedá se odstranit. Při slabém projevu lze použít síření a následnou filtraci [9, 11, 16].

2.12.7 Vláčkovatění – slizovatění

Vláčkovatění způsobují bakterie, které kolem sebe vytváří slizovitý obal. Vína s touto vadou jsou hustá a viskózní, chuť a aroma bývají nevýrazné a také mívají vysoký obsah těkavých kyselin. K odstranění vláčkovatění se používá především síření nebo prudké provzdušňování a následná filtrace [9, 16].

2.12.8 Octovatění

Je to nejnebezpečnější vada vína, která může znehodnotit sudy a infikovat celý sklep. Octovatění způsobují octové bakterie *Acetobacter*, které přeměňují alkohol na kyselinu octovou až na vodu. Víno s octovým aroma obsahuje vysoký podíl těkavých kyselin a svou vůni připomíná acetonové ředidlo nebo odlakovače na nehty. Octovatění vína se dá zabránit pouze tehdy, když se ještě neprojevovalo ve vůni a chuti vína. Používá se silné síření moštů a rmutů, pokud se již octovatění projevilo, nepomůže ani pasterace vína [9, 10, 11].

3 Metody zkoušení vína a identifikace kvasinek

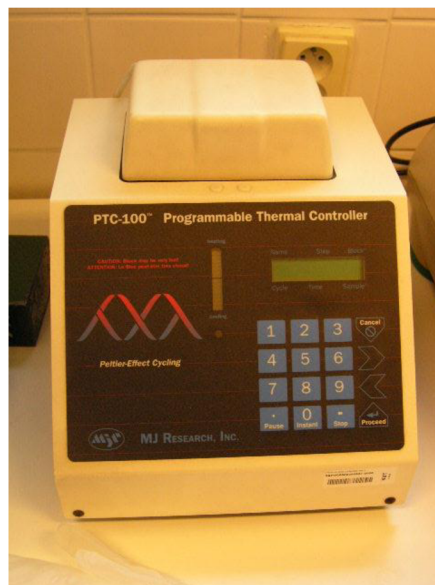
3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

V posledních letech tato moderní molekulární metoda nahrazuje klasické biochemické a mikrobiologické metody, které byly používané doposud. Výhodou PCR je její jednoduchost a především umožnění získat specifickou sekvenci genomové DNA bez předchozího klonování ve vektorech. Tato metoda je založena na replikaci nukleových kyselin a podstatou je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců jednotlivě vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5'→3' díky DNA – polymeráze. Vybrané, jednotlivé úseky nukleotidové sekvence jsou vymezeny připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tím způsobem, že 3' konce směřují k sobě. Syntéza nových vláken probíhá po přidání DNA – polymerázy a nukleotidů na obou matricových řetězcích protisměrně [24].

V závislosti na teplotě reakční směsi se v procesu PCR pravidelně střídají 3 kroky, u kterých má každý odlišné podmínky a teploty.

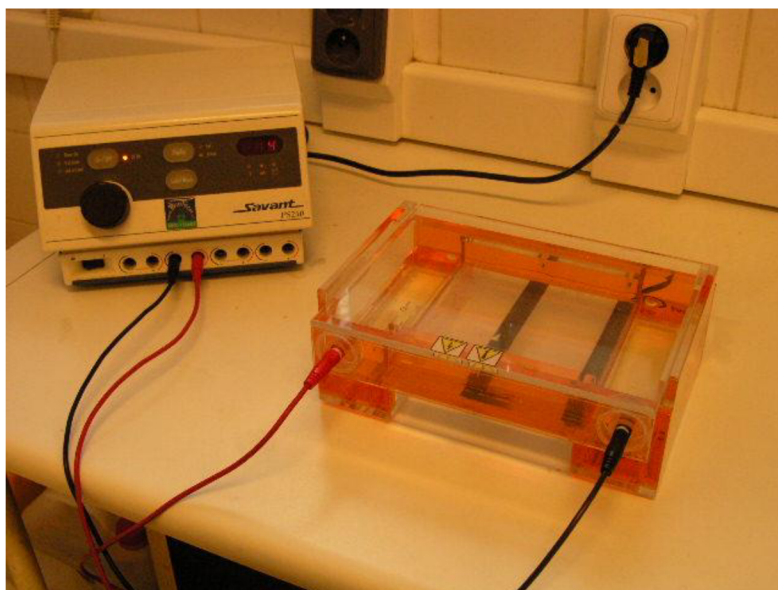
- denaturace dvouřetězcových molekul DNA (94 °C)
- připojení primerů k odděleným řetězcům DNA (30 – 65 °C)
- syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA – polymerázy (65 – 75 °C)

Tyto kroky se opakují 25 – 35krát, podle koncentrace templátové DNA. Reakce probíhají v tzv. termocykléru (Obrázek 17), ve kterém se teploty mění automaticky v jednotlivých časových intervalech. Opakováním procesu PCR se vytváří až miliarda kopií vybraného úseku molekuly. Tento proces lze zařadit do skupiny způsobů klonování DNA. Pro PCR se většinou používají jako zdroj DNA biologické materiály (hrubé extrakty z krve, kultury mikroorganismů, tělní tekutiny atd.).



Obrázek 17 Termocyklér

Výsledkem této molekulárně – biologické metody jsou tzv. amplikony, což jsou úseky DNA analogické restričním fragmentům a jejich velikost v reakční směsi se stanovuje elektroforézou (Obrázek 18) v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu [24].



Obrázek 18 Použitá elektroforéza

3.2 Stanovení polymorfizmu délky restričních fragmentů u produktů PCR

Metoda PCR – RFLP je modifikovaná standardní PCR, která se používá zejména pro typizaci cílové sekvence určitého genu, který obsahuje sekvenční polymorfismus. Touto metodou lze analyzovat jakýkoliv gen, podle volby primerů. Princip této metody spočívá v amplifikaci sekvencí o délce až 5 kb pomocí primerů, které se připojují ke koncovým konzervovaným oblastem. Výsledkem jsou produkty PCR o stejné délce a detekují se elektroforeticky. Amplifikované produkty jsou dále štěpeny restriční endonukleázou a znovu analyzovány elektroforeticky na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu [24].

3.2.1 Zpracování výsledků v programu BioNumerics

Program BioNumerics je software, který nabízí integrovanou analýzu nejrůznějších biologických dat a to především elektroforetické gely, chromatografie nebo fenotypové znaky a sekvence. Je to statistický program, který byl využit pro srovnání genetických podobností námi testovaných kvasinek. Byla použita tzv. UPGMA (unweighted pair-group average) shluková analýza, na základě které byl vytvořen dendrogram genetické podobnosti identifikovaných kvasinek. Tato shluková nebo také klastrová analýza patří mezi metody, které se zabývají rozdělením proměnných do jednotlivých tříd podle jejich podobnosti. V programu BioNumerics se jedná o rozdělení jednotlivých velikostí fragmentů na elektroforetických gelech. V případě, že znaky mají nemetrický charakter, se využívá tzv. Jaccardova koeficientu, což je koeficient podobnosti.

Metoda průměrné vzdálenosti (UPGMA) bere mezi dvěma shluky jejich průměr vzdálenosti mezi všemi páry objektů těchto shluků. Výsledkem je, že taxony, které jsou si nejméně podobné, mezi sebou mají nejkratší vzdálenost. Výsledný dendrogram je grafické uspořádání hierarchicky uspořádaných shluků a díky němu lze taxonomicky zařadit organismy nebo identifikovat nemoci a jejich stádia [37].

3.3 Stanovení pH

Hodnota pH se definuje jako záporně vzatý dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů v roztoku. V průběhu zrání hroznů se hodnota pH mění od 2,80 – 3,50, podle odrůdy, ročníku nebo klimatických podmínek. Hodnota pH se stanovuje buď pomocí chemických pH indikátorů nebo pH metrem, který měří pH pomocí kombinované elektrody. Kombinovaná elektroda se skládá ze skleněné argenochloridové elektrody, stříbrné referenční elektrody a teplotním čidlem. Je nutné kalibrovat pH metr podle oblastí, ve kterých měří. Pro kyselou oblast se používají dva pufrы o pH 4,00 a 7,00, pro alkalickou oblast pufrы o pH 7,00 a 10,00 [30, 31].

3.4 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Antioxidanty v těle tvoří součást ochranného systému proti toxickému působení volných radikálů. Z chemického hlediska jsou to látky, které zabraňují oxidaci jiné látky reaktivním metabolitem, tím způsobem, že se sama zoxiduje. Výsledkem antioxidační aktivity je tedy ochrana biologicky důležitých molekul a tím pádem ochrana tkání, buněk a celého organismu proti působení volných radikálů. Antioxidační aktivita látek bývá zkoumána ve dvou systémech a to *in vitro* a *in vivo*. Pokud antioxidant účinkuje v jednom systému za určitých podmínek, není pravidlem, že bude fungovat v systému druhém s jinými podmínkami [33].

Antioxidanty se dělí podle dvou kritérií:

1. Podle molekulové hmotnosti:
 - vysokomolekulární (enzymové, neenzymové)
 - nízkomolekulární (přírodní, syntetické)
2. Podle místa nejčastějšího výskytu:
 - cytoplazmatické (hydrofilní)
 - membránové (lipofilní)

Ve víně jsou obsaženy především nízkomolekulární, přírodní antioxidanty nazývané flavonoidy. Jsou to fenolové, barevné látky, které mají zvýšenou antioxidační aktivitu, neboť jedna molekula flavonoidu vychytává až 6 – 9 peroxylových radikálů. Na antioxidační vlastnosti má vliv struktura flavonoidů, musí obsahovat minimálně dvě fenolové skupiny, ale platí, že čím více fenolových skupin flavonoid má, tím větší má svou antioxidační aktivitu. Mezi pozitivní vlastnosti flavonoidů patří jejich vliv na kardiovaskulární systém nebo jejich protinádorový účinek, kdy inhibují vazbu kancerogenů na DNA [33].

4 Experimentální část

4.1 Použité přístroje a pomůcky

- Spektrofotometr Helios Delta (Spectronic Unicam, UK)
- pH metr
- Analytické váhy (A&D, Instruments LTD, Japonsko)
- Bakteriologické klíčky
- Buničitá vata
- Bunsenův kahan
- Centrifuga Eppendorf 5430 R (Eppendorf AG, Německo)
- Elektroforetická vana Owl separation systeme, model B1, B2, D3 (Biotech s.r.o., ČR)
- Exsikátor
- Laboratorní sklo
- Lednice a mrazák k uchování vzorků DNA
- Mikropipety Biohit (Biotech s.r.o., ČR)
- Mikropipety pipet4u (AHN Biotechnologie GmbH, Německo)
- Mikrovlnná trouba ETA 1195 (ČR)
- Mikrozkuhavky Eppendorf
- Minicentrifuga National LABNET C – 1200 (Biotech s.r.o., ČR)
- NanoPhotometer™ UV/Vis (Implen GmbH, Mnichov, Německo)
- Parafilm (American Nacional Can™, USA)
- PCR box AURA MINI (Bioair instruments, Itálie)
- Plastové Petriho misky
- Předvážky EK - 600 H (A&D, Instruments LTD, Japonsko)
- Sušárna (Binder, Německo)
- Sterilní box pro mikrobiologickou práci

4.2 Chemikálie

- Agar, kvasniční extrakt (HiMedia Laboratories Limited Mumbai, Indie)
- Agaróza pro elektroforézu DNA EliPhore (Elizabeth Pharmacon s.r.o., ČR)
- ADH Sigma 7011-7,5 KU
- Délkový standard 100 bp (Elizabeth Pharmacon s.r.o., ČR)
- dNTP mix (Invitek, Německo)
- DPPH (Sigma-Aldrich, Německo)
- Ethidium bromid (Serva Bitech, Německo)
- Folin - Ciocalteuovo činidlo (Penta, ČR)
- Komerční sada Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit (Elizabeth Pharmacon spol.s.r.o., ČR)
- Kyselina gallová (Penta, ČR)
- Quant-iT™ ds DNA HS Assay Kit 0,2 – 100 ng
- Taq DNA polymerasa (Invitek, Německo)

- 10× Taq pufr pro PCR mix (Invitek, Německo)
- Primery ITS1, ITS4 (Invitek, Německo)
- Nanášecí pufr Loading buffer (Fermentas, Litva)
- Restrikční endonukleasy – HinfI, HaeIII (BioLabs, TaKaRa)
- Ethanol, methanol, EDTA, Tris, H₃BO₃, NaOH, CH₃COONa, HCl, Na₂CO₃
- Fruktóza, glukóza, sacharóza (Lachema a.s., ČR)
- Kyselina citronová, vinná, jablečná, jantarová, mléčná a octová (Lachema a.s., ČR)
- Parafinový olej
- Sladina (pivovar Brno)
- Sterilní a deionizovaná voda

4.3 Analyzované vzorky vína

Pro izolaci a identifikaci kvasinek byly použity vzorky dokvašeného moštu ze sudu odrůdy Veltlínské zelené dodané od soukromého vinaře. Tyto vzorky byly přefiltrovány přes bakteriologické filtry a následně kultivovány na pevných médiích v termostatu.

Pro sledování chemických změn v kvasném procesu byly použity vzorky moštu odrůdy Hibernál z vinařství Štěpán Maňák Žádovice. Analyzovaný mošt byl zakvašen autochtonní kvasinkou vyizolovanou minulý akademický rok (2014/15) z povrchu bobulí Hibernál. Vzorky byly odebírány v jednotlivých fázích kvasného procesu. Seznam analyzovaných vzorků znázorňuje Tabulka 1.

Tabulka 1 Seznam analyzovaných vzorků moštů

Fáze	Vzorek	Datum odběru vzorku	Odrůda
Před zakvašením kvasinkou	HIB-0	28.10.2015	Hibernál
V průběhu kvasného procesu	HIB-1	2.11.2015	
	HIB-2	4.11.2015	
	HIB-3	6.11.2015	
	HIB-4	9.11.2015	
Počátek zrání vína	HIB-5	23.11.2015	
Po odležení vína na kvasinkách	HIB-6	15.3.2016	
Počátek zrání vína	VZ	23.11.2015	Veltlínské zelené

4.4 Příprava kultivačních médií

4.4.1 Sladinový agar

Do odměrného válce o objemu 500 ml bylo nalito 200 ml sladiny získané extrakcí ječmenného sladu ve vodě. Roztok byl zředěn vodou na cukernatost 7 °ČSN, uhličitánem sodným bylo upraveno pH na 6,8. Roztok byl převeden do Erlenmayerových baněk a byl přidán agar o koncentraci 1 – 3 % hm. Směs byla promíchána varem a 20 minut sterilizována. Kultivační médium bylo nalito do Petriho misek a jako šikmé agary do zkumavek a použito pro kultivaci a úchovu kvasinek.

4.4.2 Sladinové médium s antibiotikem

K připravenému sladinovému agaru (150 ml) bylo přidáno antibiotikum streptomycin sulfát o koncentraci 80 µg/ml. Roztok antibiotika byl připraven navážením 0,12 g a následným rozpuštěním v 10 ml destilované vody. Kultivační médium bylo nalito do Petriho misek.

4.5 Příprava pracovních roztoků

4.5.1 Příprava roztoku DPPH

Bylo naváženo 0,0015 g DPPH. Navážka byla rozpuštěna v methanolu, poté kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněna methanolem po rysku.

4.5.2 Příprava 0,5 M EDTA o pH 8

Navážka 9,36 g EDTA byla rozpuštěna v destilované vodě a kvantitativně převedena do 50 ml odměrné baňky. Hodnota pH byla upravena na 8 pomocí 0,5 % roztoku NaOH. Tato směs byla rozmíchávána na elektrické míchačce do úplného rozpuštění EDTA, a poté byla odměrná baňka doplněna po rysku vodou.

4.5.3 Příprava 10×TBE pufru

Z roztoku 0,5 M EDTA bylo odebráno 40 ml do 1000 ml odměrné baňky. Poté bylo přidáno 108 g Tris a 55 g H₃BO₃. Vše bylo rozpuštěno a doplněno destilovanou vodou po rysku.

4.5.4 Příprava 1×TBE pufru

Z připraveného zásobního roztoku TBE pufru bylo do 1000 ml odměrné baňky odměřeno 100 ml a doplněno po rysku destilovanou vodou. Tento roztok byl následně použitý k přípravě gelů a jako vodivostní pufr pro elektroforézu.

4.5.5 Příprava EtBr

Roztok ethidium bromidu byl připraven navážením 10 mg EtBr do mikrozkušavky Eppendorf a následným rozpuštěním v 1 ml destilované vody. Roztok byl použitý pro vizualizaci fragmentů DNA na gelu.

4.5.6 Příprava 1×TBE pufru s ethidium bromidem

Do odměrné baňky o objemu 1000 ml s připraveným 1×TBE pufrům bylo přidáno 100 µl ethidium bromidu. Tento roztok byl používán jako vodivostní pufr při elektroforetické detekci fragmentů DNA.

4.5.7 Příprava délkového standardu 100 bp

Délkový standard 100 bp byl dodán připravený a byl aplikován na gel v množství 3 µl.

4.5.8 Příprava PCR směsi

PCR směs se byla připravena z:

- sterilní voda – 128,7 µl
- pufr – 15 µl
- dNTP mix – 3 µl
- primer ITS 1 – 0,6 µl
- primer ITS 4 – 0,6 µl

K celkovému množství 147,9 μ l směsi byly přidány 1,5 μ l DNA a 0,6 μ l Taq polymerázy. Příprava negativní kontroly byla stejná, ale místo DNA byly do směsi přidány 1,5 μ l sterilní vody.

4.5.9 Příprava 2% agarózového gelu

V Erlenmayerově baňce byly smíchány 2 g agarózy s 100 ml 1 \times TBE pufru. Směs byla rozpuštěna opakovaným varem v mikrovlnné troubě. K rozpuštěné a zchlazené směsi byl přidán EtBr v poměru 1:10000 k celkovému množství gelu. Připravený roztok byl použit do elektroforetické vany pro elektroforetickou detekci DNA fragmentů po PCR a restrikční analýze.

4.5.10 Příprava 3 M octanového pufru

3 M roztok CH₃COONa byl připraven rozpuštěním 2,46 g CH₃COONa v 7 ml destilované vody. Hodnota pH byla upravena na 5,5 pomocí koncentrované HCl. Roztok byl kvantitativně převeden do 10 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. Připravený roztok byl uchován při 4 °C a používán pro přečištění PCR produktů.

4.5.11 Příprava 80 % ethanolu

1,6 ml 96% ethanolu bylo smícháno s 0,32 ml destilované vody a tato směs byla krátce zvortexována. Roztok byl skladován v mikrozkušavce při -20 °C a byl používán k přečištění PCR produktů.

4.6 Pracovní postupy

4.6.1 Izolace čisté kultury kvasinek

Vzorky dokvašeného moštu odrůdy Veltlínské zelené od soukromého vinaře byly přefiltrovány přes bakteriologické filtry a následně vloženy do Petriho misek se sladivým živným médiem s antibiotiky. Petriho misky byly umístěny do termostatu při teplotě 26 °C několik dní, aby došlo k potřebnému namnožení kvasinkových kultur. Pro izolaci čisté kultury kvasinek byla použita modifikovaná Kochova zředovací metoda s křížovými roztěry. Pro první tři ředění bylo použito médium s antibiotiky, aby došlo k odstranění nežádoucích bakterií a další tři ředění byly kontrolovány mikroskopem kvůli možné kontaminaci bakteriemi.

Tato metoda probíhala v aseptickém prostředí. Bakteriologickou klíčkou byla odebrána z Petriho misky dvě očka kultury, která byla důkladně rozsuspendována v 10 ml sterilní vody. Obsah byl krátce zvortexován a z promíchané suspenze bylo odebráno 50 μ l do zkumavky s 10 ml sterilní vody. Po dokonalém zvortexování byl odebrán 1 ml suspenze, který byl rozmíchán v 9 ml sterilní vody. Obsah byl znovu promíchán na vortexu a ze zkumavky bylo odebráno 50 μ l na Petriho misku se sladivým živným médiem, poté byl proveden křížový roztěr. Petriho misky se inkubovaly v termostatu 3 dny při teplotě 26 °C (Obrázek 19). Vybrané kolonie byly přeočkovány důkladným rozetřením na malé misky a inkubovány ve stejných podmínkách jako velké misky. Po šesti opakováních byly získány čisté kultury kvasinek a ty se uchovávaly v ledničce na šikmých agarech pod parafinovým olejem [32].



Obrázek 19 Petriho miska s narostlou kvasinkovou kulturou

4.6.2 Izolace DNA

Tato metoda byla provedena pomocí komerčního setu UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit.

V prvním kroku bylo do rozbíjecí zkumavky napipetováno 300 μ l rozbíjecího pufru, ve kterém byla bakteriologickou kličkou rozsuspendována dvě očka čisté kvasinkové kultury. Poté bylo přidáno 50 μ l roztoku MD1. Mikrozkumavky byly vloženy do adaptéru vortexu v horizontální poloze a při maximální rychlosti byly 10 minut vortexovány. Potom byly zkumavky centrifugovány 1 minutu při 10000 otáčkách při 4 °C. Asi 350 μ l supernatantu bylo přeneseno do čisté mikrozkumavky o objemu 2 ml, a bylo přidáno 100 μ l MD2. Tato směs byla jemně zvortexována a inkubována 5 minut při teplotě 4 °C. Po opětovné centrifugaci bylo 450 μ l supernatantu přeneseno opět do čisté mikrozkumavky, a bylo přidáno 900 μ l roztoku MD3 a směs byla zvortexována. Objem 700 μ l takto vzniklého roztoku byl přenesen na kolonku a opět centrifugován a přefiltrovaný roztok byl odstraněn. Zbytek směsi asi 300 μ l byl přenesen na tu samou kolonku a ta byla i s roztokem opět centrifugována a přefiltrovaný roztok byl znovu odstraněn. Potom bylo přidáno 300 μ l roztoku MD4 a opět centrifugováno, přefiltrovaný roztok byl odstraněn a kolonka byla znovu centrifugována. Kolonka byla opatrně přenesena do čisté mikrozkumavky a do středu bílé membrány uvnitř kolonky bylo napipetováno 50 μ l roztoku MD5 a následně centrifugováno. Kolonka byla odstraněna a roztok DNA v mikrozkumavce byl připraven pro další aplikace. Roztok byl uchován při teplotě -20 °C [32].

4.6.3 PCR

K 147,7 μ l připraveného MasterMixu, jehož příprava je popsána v kapitole 4.5.8, bylo přidáno 1,5 μ l DNA a 0,6 μ l termostabilní Taq polymerázy, poté se připravila také negativní kontrola, u které se místo DNA přidala destilovaná voda. Směs byla promíchána na vortexu a vložena do termocykléru, kde proběhla polymerázová řetězová reakce podle nastaveného programu, jehož parametry znázorňuje Tabulka 2.

Tabulka 2 Profil programu pro PCR

Krok	Teplota [°C]	Čas [min]
Denaturace	94	4
Annealing 25 cyklů	94	1
	48	0,5
	72	1
Elongace	72	10

4.6.4 Elektroforetická detekce PCR produktů

Produkty PCR byly detekovány pomocí horizontální elektroforézy na 2 % agarózovém gelu s ethidium bromidem v množství odpovídající 1/10 objemu gelu v μl . Podle počtu vzorků elektroforéza probíhala v malé, střední nebo velké vaně. Množství gelu, hodnota napětí a dobu elektroforézy znázorňuje Tabulka 3.

Tabulka 3 Parametry elektroforézy

vana	objem gelu [ml]	napětí [V]	čas [hod]
malá (14 jamek)	40	45	2
střední (20 jamek)	60	55	2
velká (50 jamek)	150	65	2 – 3

Nejprve se ztuhlý gel přelil roztokem pufru 1×TBE s ethidium bromidem, jehož příprava je popsána v kapitole 4.5.6. Určité množství pufru bylo použito takovým způsobem, aby byly zality všechny komůrky v gelu a jeho hladina dosahovala několik milimetrů nad povrch gelu. Poté byla do jamek v gelu pipetována směs 5 μl vzorku s 1 μl nanášecího pufru. Na obou okrajích gelu byl nanesen délkový standard o velikosti 100 bp v množství 3 μl . Po skončení elektroforézy byly fragmenty DNA s navázaným ethidium bromidem vizualizovány pomocí UV transluminátoru a gel byl vyfocen pomocí programu Scion Image.

4.6.5 Přečištění PCR produktů

Přečištění PCR produktů před restriční analýzou bylo provedeno smícháním 20 μl amplifikované DNA s 2 μl octanového pufru. Tato směs byla zvortexována a poté bylo přidáno 60 μl 96% ethanolu vychlazeného na teplotu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tato směs se umístila do centrifugy po dobu 30 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 15 000 otáčkách. Vzniklý supernatant byl dekantován a přebytečný roztok byl slit. Následně bylo do mikrozkušavky přidáno 60 μl 80% ethanolu a směs byla zvortexována a centrifugována po dobu 30 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 15 000 otáčkách. Supernatant byl opět dekantován, přebytečný roztok slit a mikrozkušavky se umístily do exsikátoru, aby se zbavily zbytku ethanolu [32].

4.6.6 Restriční analýza

Do mikrozkušavky bylo k přečištěným PCR produktům napipetováno 13,4 μl sterilní vody, 1,5 μl pufru a 0,1 μl enzymu. Tyto objemy byly zvoleny na základě předchozích zkušeností. Vzorky byly lehce zvortexovány a inkubovány 16 hodin při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, poté se teplota zvýšila na 20 minut kvůli inaktivaci enzymu. Seznam použitých enzymů a parametry inkubace uvádí Tabulka 4.

Tabulka 4 Použité restriční enzymy

Označení enzymu	Producent enzymu	Rozpoznávací místo	Teplota inkubace [°C]	Teplota inaktivace [°C]
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GG↓CC CC↑GG	37	80
<i>HhaI</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	GCG↓C C↑GCG	37	65
<i>Hinfl</i>	<i>Haemophilus influenza</i>	G↓ANTC CTNA↑G	37	80
<i>TaqI</i> ^a	<i>Thermus aquaticus</i>	T↓CGA AGC↑T	37	80

4.6.7 Stanovení pH

Nejprve byla provedena kalibrace přístroje standardními pufrů (4,00 a 7,00) poté bylo odměřeno 20 – 50 ml moštu o laboratorní teplotě (23 °C) a měření se provedlo třikrát. Hodnoty pH byly odečítány na 2 desetinná místa. Z naměřených hodnot se provedl aritmetický průměr [34].

4.6.8 Stanovení celkové antioxidační kapacity

Principem této metody je reakce testované látky se stabilním syntetickým radikálem difenylpikrylhydrazylem – DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Touto reakcí dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazinu). Vzniklý radikál má velmi intenzivní zbarvení a tím lze tuto reakci sledovat spektrofotometricky při vlnové délce 517 nm, která odpovídá maximu absorpance daného radikálu.

V prvním kroku byl vzorek moštu zředěn methanolem v poměru 1:2. Měření bylo provedeno na UV – VIS spektrofotometru při vlnové délce 517 nm. Po zředění vzorku bylo do kyvety odměřeno 1,5 ml zředěného vzorku (dle absorpance), dále přidáno 1,5 ml DPPH a ihned po smíchání byla kyveta umístěna do spektrofotometru. Po dobu 6 minut se odečítaly v pravidelných intervalech hodnoty absorpance, a to nejprve v čase 0 a pak každých 10 sekund. Jako slepý vzorek pro stanovení se použila směs 1,5 ml methanolu smíchaného s 1,5 ml DPPH. Tato hodnota byla důležitá pro výpočet zhášecí aktivity.

Z naměřených hodnot byla vypočtena zhášecí aktivita podle vztahu (1) a také byl sestaven graf závislosti absorpance na čase (Graf 2) a graf změn antioxidační aktivity v průběhu kvasného procesu (Graf 3).

$$DPPH \% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \cdot 100, \quad (1)$$

kde A_0 je absorpance směsi methanol a DPPH, A_1 je absorpance vzorku, ve kterém je přítomen antioxidant [34].

5 Výsledky a diskuze

5.1 Identifikace kvasinek pomocí PCR -RFLP

Cílem této práce bylo identifikovat kvasinky izolované z dokvašeného moštu odrůdy Veltlínské zelené. Vzorky dokvašeného moštu, které byly zaočkovány autochtonní kvasinkou vyizolovanou v akademickém roce 2014/2015 z bobulí odrůdy Híbernal, nám poskytl soukromý vinař z okolí Milotic, okres Hodonín.

5.1.1 Kultivace kvasinek

Připravené vzorky (Tabulka 1) byly asepticky odebrány do sterilních lahví a následně přefiltrovány přes bakteriologické filtry, aby nedošlo ke kontaminaci nežádoucími bakteriemi nebo jinými mikroorganismy. Získané směsné kultury byly kultivovány na Petriho miskách se sladidlovým živným médiem s antibiotiky v termostatu při teplotě 26 °C několik dní. Poté byly kultury několikrát přeočkovány pomocí Kochovy metody a křížových roztěrů, popsanych v kapitole 4.6.1, dokud nebyla získána čistá kvasinková kultura.

5.1.2 Izolace DNA

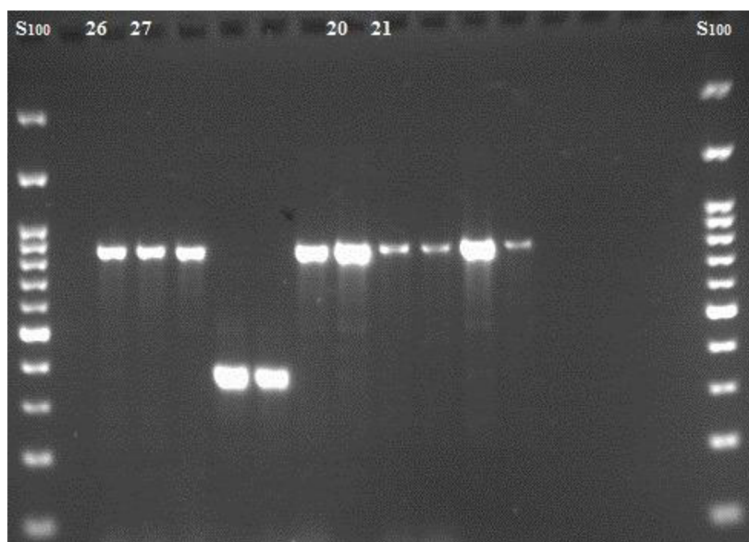
Z čistých kvasinkových kultur byla vyizolována DNA pomocí komerčního setu Clean™ Microbial DNA Isolation Kit. Postup izolace je uveden v kapitole 4.6.2. Výsledné produkty byly poté uchovány pro další využití hlubokým zmrazením při teplotě – 20 °C.

5.1.3 Amplifikace DNA pomocí PCR

Vyizolovaná DNA byla amplifikována pomocí PCR postupem uvedeným v kapitole 5.1.3. Pro tuto metodu byly použity nespecifické fragmenty ITS1 a ITS4. Produkty PCR byly detekovány na agarózovém gelu pomocí elektroforezy postupem uvedeným v kapitole 4.6.4. Byly získány fragmenty o délce 880 bp (Tabulka 5), které byly porovnány s databází, a bylo zjištěno, že se s největší pravděpodobností jedná o kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*. Elektroforeogram získaných PCR produktů zobrazuje Obrázek 20.

Tabulka 5 Velikost ampliconů oblastí 5,8S-ITS

Vzorky	Velikost PCR produktu [bp]
VZ – 20	880
VZ – 21	880
VZ – 26	880
VZ – 27	880



Obrázek 20 Elektroforeogram PCR produktů (20, 21, 26, 27) získaný amplifikací 5,8S-ITS oblastí izolovaných kvasinek. S100-délkový standard 100 bp.

5.1.4 Restrikční analýza

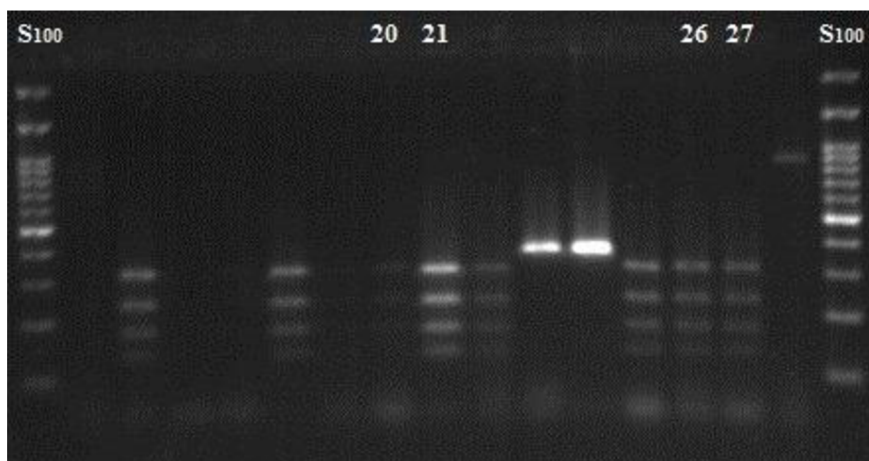
Úseky DNA po amplifikaci byly přečištěny postupem uvedeným v kapitole 4.6.5 a použity k restrikční analýze, jejíž postup je uveden v kapitole 4.6.6. Endonukleázy, které byly použity pro restrikční analýzu, uvádí Tabulka 4.

Restrikční endonukleáza *HaeIII*

První restrikční endonukleázou použitou pro restrikční analýzu byla *HaeIII*, jejímž producentem je *Haemophilus aegyptius*. Rozpoznávací místo, teplota inkubace a inaktivace této endonukleázy uvádí Tabulka 4. Ukázkou elektroforeogramu znázorňuje Obrázek 21 a zjištěné velikosti fragmentů uvádí Tabulka 6.

Tabulka 6 Velikost restrikčních fragmentů, které byly získány štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *HaeIII*

Vzorky	Velikost PCR produktu [bp]	RF [bp]
VZ – 20	880	310+240+170+130
VZ – 21	880	310+240+170+130
VZ – 26	880	310+240+170+130
VZ – 27	880	310+240+170+130



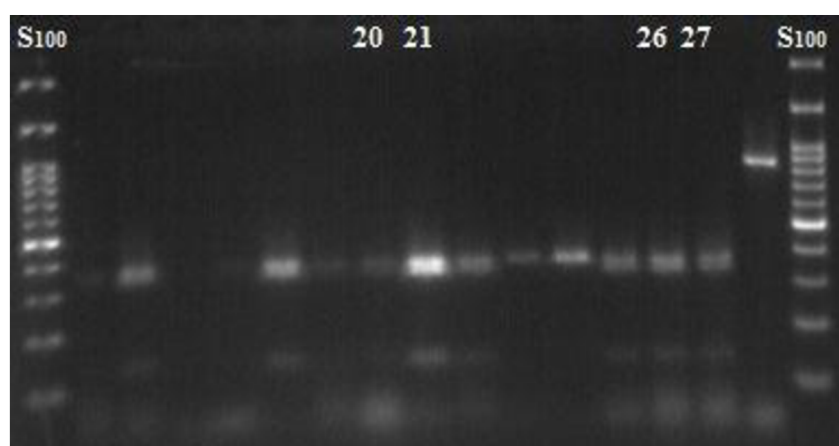
Obrázek 21 Elektroforeogram restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktů (20,21, 26, 27) restrikční endonukleázou *HaeIII*, S100-délkový standard 100 bp.

Restrikční endonukleáza *HinfI*

Druhá restrikční endonukleáza použitá pro restrikční analýzu byla *HinfI*, jejímž producentem je *Haemophilus haemolyticus*. Rozpoznávací místo, teplota inkubace a inaktivace této endonukleázy uvádí Tabulka 4. Ukázku elektroforeogramu znázorňuje Obrázek 22 a zjištěné velikosti fragmentů uvádí Tabulka 7.

Tabulka 7 Velikost restrikčních fragmentů, které byly získány štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *HinfI*

Vzorky	Velikost PCR produktu [bp]	RF [bp]
VZ – 20	880	350+120
VZ – 21	880	350+120
VZ – 26	880	350+120
VZ – 27	880	350+120



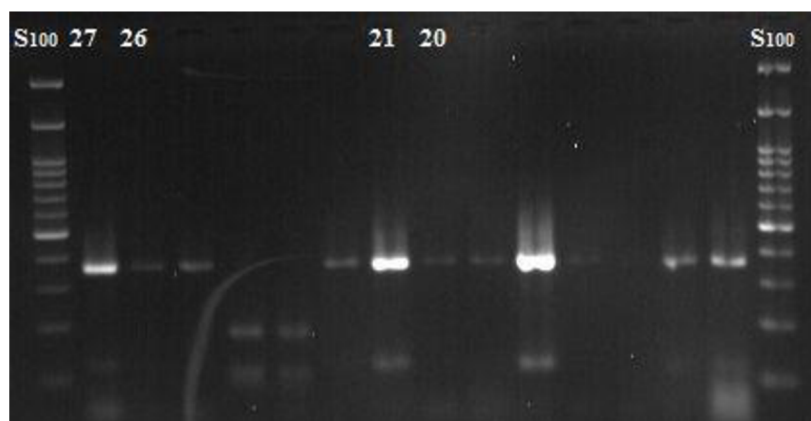
Obrázek 22 Elektroforeogram restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktů (20,21, 26, 27) restrikční endonukleázou *HinfI*, S100-délkový standard 100 bp.

Restrikční endonukleáza *HhaI*

Třetí restrikční endonukleázou použitou pro restrikční analýzu byla *HhaI*, jejímž producentem je *Haemophilus influenza*. Rozpoznávací místo, teplota inkubace a inaktivace této endonukleázy uvádí Tabulka 4. Ukázku elektroforeogramu znázorňuje Obrázek 23 a zjištěné velikosti fragmentů uvádí Tabulka 8.

Tabulka 8 Velikost restrikčních fragmentů, které byly získány štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *HhaI*

Vzorky	Velikost PCR produktu [bp]	RF [bp]
VZ – 20	880	380+350+140
VZ – 21	880	380+350+140
VZ – 26	880	380+350+140
VZ – 27	880	380+350+140



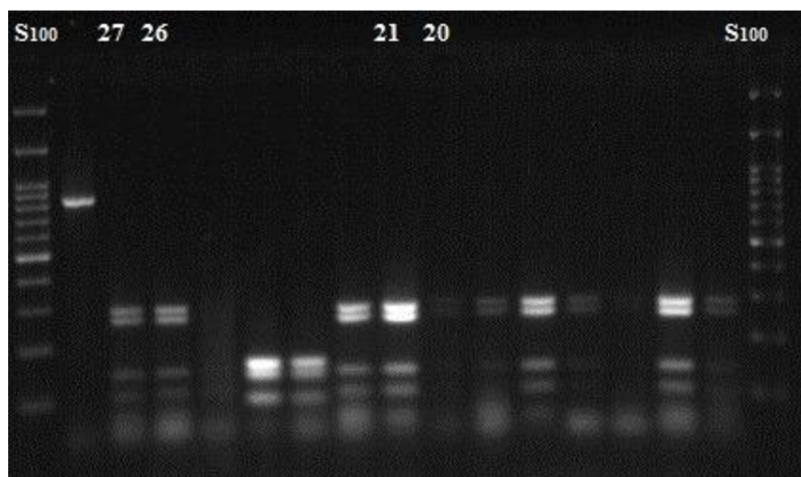
Obrázek 23 Elektroforeogram restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktů (20, 21, 26, 27) restrikční endonukleázou *HhaI*, S100-délkový standard 100 bp.

Restrikční endonukleáza *Taq^a*

Poslední restrikční endonukleázou, která byla použita pro restrikční analýzu, byla *Taq^a*, jejímž producentem je *Thermus aquaticus*. Rozpoznávací místo, teplota inkubace a inaktivace této endonukleázy uvádí Tabulka 4. Ukázku elektroforeogramu znázorňuje Obrázek 24 a zjištěné velikosti fragmentů uvádí Tabulka 9.

Tabulka 9 Velikost restrikčních fragmentů, které byly získány štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *Taq^a*

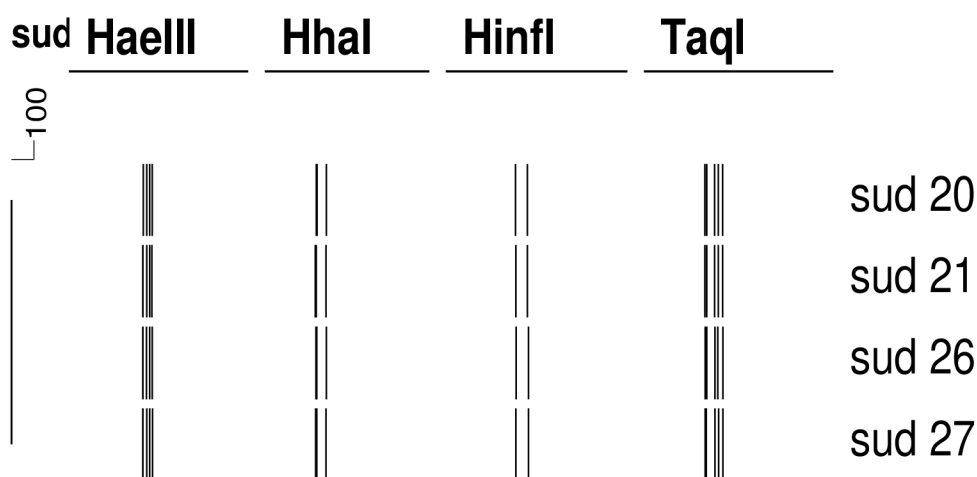
Vzorky	Velikost PCR produktu [bp]	RF [bp]
VZ – 20	880	300+280+140+100+60
VZ – 21	880	300+280+140+100+60
VZ – 26	880	300+280+140+100+60
VZ – 27	880	300+280+140+100+60



Obrázek 24 Elektroforeogram restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktů (20,21, 26, 27) restrikční endonukleázou Taq^a, S100-délkový standard 100 bp.

5.1.5 Genetická podobnost kvasinek izolovaných ze vzorků mladého vína odrůdy Veltlínské zelené

Vyhodnocení získaných elektroforeogramů z restrikčních analýz bylo provedeno ve statistickém programu BioNumerics. Tento program porovnává genetickou podobnost kvasinek pomocí klastrové analýzy fragmentů DNA po restrikční analýze, tímto programem byl vytvořen dendrogram restrikčních fragmentů (Obrázek 25). Na základě délek těchto fragmentů a následným porovnáním s databází bylo určeno, že ve vzorku dokvašeného moštu odrůdy Veltlínské zelené se pravděpodobně nachází stejná kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*.



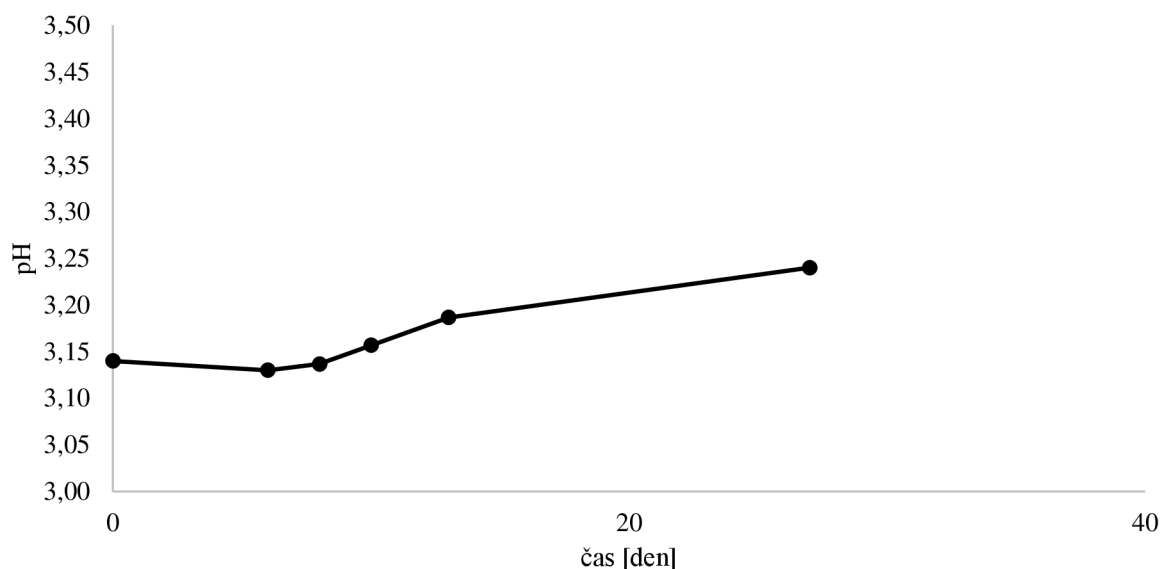
Obrázek 25 Dendrogram restrikčních fragmentů kvasinek izolovaných ze vzorků VZ

5.2 Stanovení pH

Podle postupu uvedeného v kapitole 4.6.7 bylo stanoveno pH u vzorků moštu Hibernal v průběhu kvasného procesu, na počátku zrání a u vzorku hotového vína. Vzorky moštu byly nejprve vytemperovány na pokojovou teplotu (23 °C) a poté se následovalo vlastní měření, které se provedlo třikrát. Výsledky měření shrnuje Tabulka 10.

Tabulka 10 *Výsledky stanovení pH v průběhu kvasného procesu*

datum odběru	vzorek	pH			průměr
28.10.	HIB0	3,1	3,15	3,17	3,14
2.11.	HIB1	3,07	3,14	3,18	3,13
4.11.	HIB2	3,06	3,16	3,19	3,14
6.11.	HIB3	3,12	3,16	3,19	3,16
9.11.	HIB4	3,13	3,19	3,24	3,19
23.11.	HIB5	3,19	3,25	3,28	3,24
15.3.	HIB6	3,21	3,25	3,27	3,24



Graf 1 *Změna závislosti pH na čase v průběhu kvasného procesu*

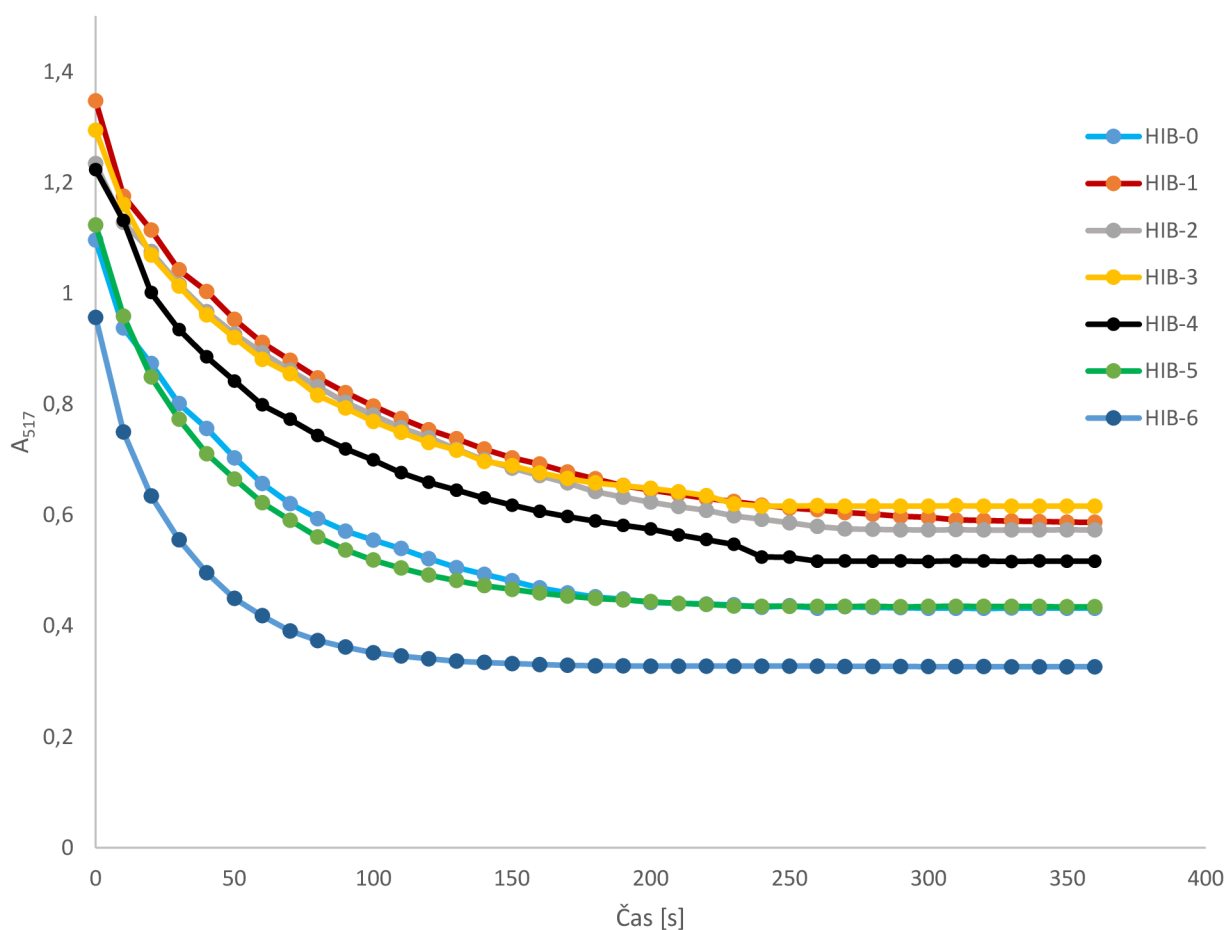
Změny pH během kvasného procesu znázorňuje Graf 1, ze kterého je patrné, že se hodnoty pH během kvasného procesu výrazně nezměnily. Hodnota pH byla před zahájením kvasného procesu HIB-0 stanovena na 3,14. V začátku kvašení došlo k nepatrnému snížení pH na hodnotu 3,13, a to u vzorku HIB-1, ale hned poté se začalo pH zvyšovat. V závěru kvašení byla hodnota pH stanovena u vzorku HIB-5 na 3,24. Stejnou hodnotu měl i vzorek mladého vína HIB-6 odebraný 15.3. 2016. Celkově lze říci, že pH moštu se během kvasného procesu mění minimálně.

5.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity

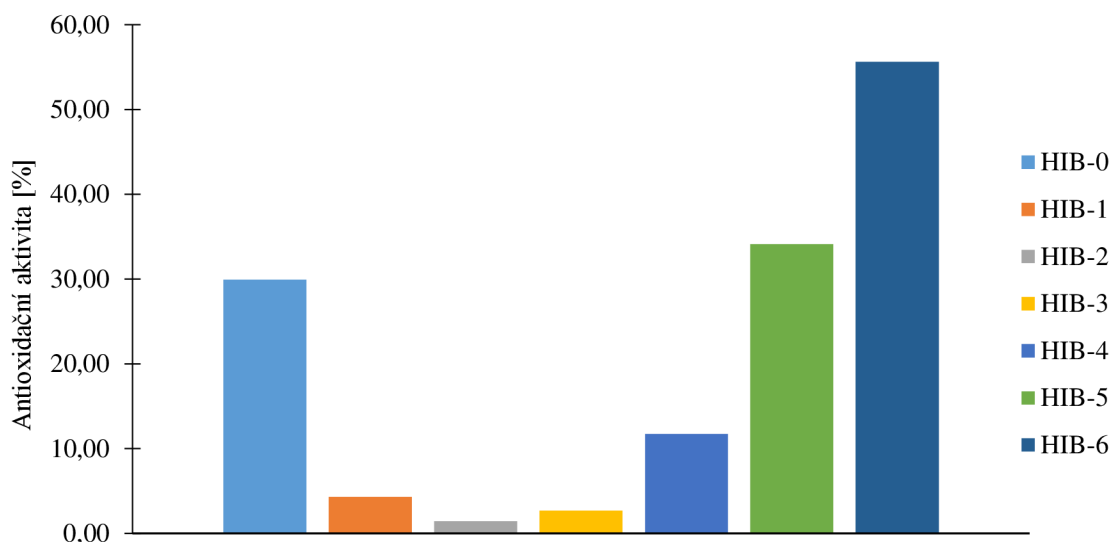
Stanovení celkové antioxidační aktivity bylo provedeno u vzorků moštu Hibernál podle postupu v kapitole 4.6.8. Měření bylo provedeno během celého kvasného procesu, na počátku zrání a ve vzorku hotového vína. Vypočtené zhášecí aktivity uvádí Tabulka 11 a závislost absorbance na čase znázorňuje Graf 2.

Tabulka 11 Vypočtená antioxidační aktivita

Vzorky	Antioxidační aktivita [%]
HIB – 0	29,94 ± 3,30
HIB – 1	4,29 ± 0,56
HIB – 2	1,43 ± 1,08
HIB – 3	2,70 ± 0,96
HIB – 4	11,74 ± 3,00
HIB – 5	34,11 ± 1,33
HIB – 6	55,62 ± 1,70



Graf 2 Změna závislosti absorbance na čase v průběhu kvasného procesu



Graf 3 Změna antioxidační aktivity v průběhu kvasného procesu

Srovnání zhášecích aktivit v procentech znázorňuje Graf 3. U vzorku HIB-0, který byl odebrán před začátkem kvasného procesu, byla zhášecí aktivita stanovena na hodnotu $29,94 \pm 3,30$ %. Tato hodnota je pravděpodobně dána obsahem biologicky aktivních látek v čerstvém moštu před zakvašením.

U vzorků, které byly odebrány během kvasného procesu, došlo ke snížení zhášecí aktivity až na hodnotu $1,43 \pm 1,08$ %. Domnívám se, že k tomuto poklesu mohlo dojít působením vinařských kvasinek, které využívají biologicky aktivní látky z čerstvého moštu pro svůj růst a tím dochází k poklesu antioxidační aktivity moštu v průběhu kvašení.

K prudkému nárůstu zhášecí aktivity došlo u vzorku HIB-4 na hodnotu $11,74 \pm 3,00$ % a HIB-5 $34,11 \pm 1,33$, kdy víno tzv. leželo na kalech. V této fázi kvasného procesu dochází k vytváření profilu vína a sensorických vlastností tím, že zde stále působí určitá část kvasinek, které ještě neodumřely. Kvasinky mají svůj vlastní antioxidační systém a tím dochází ke zvyšování množství biologicky aktivních látek a antioxidační aktivitu moštu.

Poslední vzorek se zvýšil až na $55,62 \pm 1,70$ %, čímž se téměř zdvojnásobil nárůst mezi vzorky HIB-1 a HIB-6. Tento nárůst antioxidační aktivity by mohl odpovídat vlivu přidavku oxidu siřičitého, který podle článku autorů Fic a kolektiv [38] může určitým podílem přispívat na zvýšení celkové antioxidační aktivity vína.

6 Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá sledováním vlivu kvasinek na proces výroby vína. V rámci teoretické části byla zpracována stručná literární rešerše na:

- morfologii a fyziologii hroznů
- charakteristiky analyzovaných odrůd Veltlínské zelené a Hibernál
- chemické složení hroznů
- technologii výroby vína
- charakteristiku vinařských kvasinek rodu *Saccharomyces*
- vady vína
- metody izolace a identifikace kvasinek – PCR, PCR – RFLP
- použité spektrofotometrické metody – stanovení pH, stanovení celkové antioxidační kapacity

V rámci experimentální části této práce byly izolovány a identifikovány kvasinky ze vzorků dokvašeného moštu odrůdy Veltlínské zelené od soukromého vinaře z vinice v okolí Milotic, okres Hodonín, které byly odebrány 23.11. 2015. Kvašení probíhalo v tomto případě bez přídavku komerčních kvasinek a cílem práce bylo sledování vlivu přirozené mikroflóry na charakter vyráběného vína. K analýze těchto vzorků byly použity základní mikrobiologické postupy a molekulárně – biologické metody PCR a PCR – RFLP. K izolaci DNA byl použit komerční set UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit, k amplifikaci byly použity primery ITS1 a ITS4 ve zvolené oblasti 5,8S-ITS rDNA a pro restrikční analýzu se využily restrikční endonukleázy *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI* a *TaqI*[®]. Pomocí molekulárně – biologických metod a databází bylo zjištěno, že ve všech vzorcích dokvašeného moštu odrůdy Veltlínské zelené VZ-20, VZ-21, VZ-26 a VZ-27 byla přítomna pouze kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, která byla vyhodnocena jako dominantní a tím byla potvrzena čistota kvasného procesu.

V další části práce byly analyzovány vzorky moštů (HIB 1-6) v průběhu kvasného procesu odrůdy Hibernál z vinařství Štěpán Maňák ze Žádovic. U těchto moštů byly sledovány chemické změny během kvasného procesu, a to hodnota pH a celková antioxidační aktivita. U stanovení pH lze celkově říci, že hodnota pH moštu se během kvasného procesu výrazně nemění. Dalším měřeným parametrem bylo stanovení celkové antioxidační aktivity, ta během kvasného procesu prudce klesla díky nárůstu vinařských kvasinek, ale při dokvašení a zrání vína prudce stoupla, kvůli přídavku SO₂.

7 Seznam použité literatury

- [1] PAVLOUŠEK, Pavel a Pavla BUREŠOVÁ. *Vše, co byste měli vědět o víně: --a nemáte se koho zeptat*. 1. vyd. Praha: Grada, 2015. ISBN 978-80-247-4351-6.
- [2] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2012. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-145-0.
- [3] DOSTÁLOVÁ, Jana a Pavel KADLEC. *Potravinářské zbožížnalství: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2014. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-208-2.
- [4] DRDÁK, Milan. *Základy potravinářských technologií spracovania rastlinných a živočíšnych surovín, cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravin*. 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum, 1996. ISBN 80-967-0641-1
- [5] SEDLO, Jiří a Ivana LUDVÍKOVÁ. *Přehled odrůd révy 2014*. Velké Bílovice: Svaz vinařů ČR ve spolupráci s ÚKZÚZ, 2014. ISBN 978-80-903534-7-3.
- [6] KRAUS, Vilém. *Pěstujeme révu vinnou*. 2., aktualiz. a rozš. vyd. Praha: Grada, 2012. Česká zahrada. ISBN 978-80-247-3465-1.
- [7] *Rostliny: [obrazová encyklopedie rostlin celého světa]*. Redaktor Janet Marinelli. V Praze: Knižní klub, 2006. ISBN 80-242-1579-9.
- [8] RICHTER, Miloslav. *Velký atlas odrůd ovoce a révy*. Vyd. 1. Lanškroun: TG TISK, c2002. ISBN 80-238-9461-7.
- [9] KRAUS, Vilém. *Réva a víno v Čechách a na Moravě*. Vyd. 1. Praha: Radix, 1999. Tradice a současnost (Radix). ISBN 80-860-3123-3.
- [10] SIMON, Joanna. *O víně*. Vyd. 2. Překlad Lenka Svobodová. Praha: Slovart, 2011. ISBN 978-80-7391-557-5.
- [11] KUTTELVAŠER, Zdeněk. *Abeceda vína*. Vyd. 1. Praha: Radix, 2003. ISBN 80-860-3143-8.
- [12] KRAUS, Vilém, Vítězslav HUBÁČEK a Petr ACKERMANN. *Rukověť vinaře*. 3. vyd. Praha: Brázda, 2010. ISBN 978-80-209-0378-5.
- [13] JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDOVIÁ. *Úvod do biologie kvasinek*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-990-1.
- [14] KRAUS, Vilém, Zuzana FOFFOVÁ a Bohumil WURM. *Nová encyklopedie českého a moravského vína*. Praha: Praga Mystica, 2008. ISBN 80-867-6700-0.
- [15] PAVLOUŠEK, Pavel. *Pěstování révy vinné v zahradách*. 1. Brno: CP Books, 2005. ISBN 80-251-0840-6.

- [16] PAVLOUŠEK, Pavel. *Výroba vína u malovinařů*. 2., aktualiz. a rozš. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3487-3.
- [17] HERNANDEZ, L. β – Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2003, **80**(2), 171-176 [cit. 2016-04-14]. DOI: 10.1016/S0168-1605(02)00149-6. ISBN 10.1016/S0168-1605(02)00149-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160502001496>
- [18] ČEPIČKA, Jaroslav. *Obecná potravinářská technologie*. 1. Praha: VŠCHT, 1995. ISBN 80-7080-239-1.
- [19] FIALKOVÁ, Božena. *Enologie a odborná degustace*. 2. Praha: Vysoká škola hotelová v Praze 8, 2005. ISBN 80-86578-53-8.
- [20] BURG, Patrik a Pavel ZEMÁNEK. *Stroje a zařízení pro vinařství*. 1. Olomouc: AGRIPRINT, s.r.o., 2014. ISBN 978-80-87091-49-4.
- [21] BURG, Patrik a Pavel ZEMÁNEK. *Technika pro vinařství*. 1. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2013. ISBN 978-80-7375-910-0.
- [22] PAVLOUŠEK, Pavel. *Encyklopedie révy vinné*. 2. Brno: Computer Press, 2008. ISBN 978-80-251-2263-1.
- [23] PELIKÁN, Miloš, František DUDÁŠ a Drahomír MÍŠA. *Technologie kvasného průmyslu*. 1. Brno: MZLU, 1996. ISBN 80-7157-240-3.
- [24] ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKAŘ, Roman PANTUČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. 1. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [25] SVOBODOVÁ, Ludmila. *Vinohradnictví*. Mělník: Vyšší odborná škola zahradnická a Střední zahradnická škola ve spolupráci s nakl. Rebo, 2012. ISBN 978-80-904782-4-4.
- [26] SHI, John, Jianmel YU, Joseph E. POHORLY a Yukio KAKUDA. Polyphenolics in Grape Seeds—Biochemistry and Functionality. *Journal of Medicinal Food* [online]. 2003, **6**(4), 291-299 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1089/109662003772519831. ISSN 1096-620x. Dostupné z: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/109662003772519831>
- [27] JIMÉNEZ, J. a T. BENÍTEZ. Adaptation of yeast cell membranes to ethanol. *Applied and environmental microbiology* [online]. 1987, **53**(5), 1196-1198 [cit. 2016-05-02]. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/53/5/1196.full.pdf>
- [28] Potraviny s chráněným označením. *Státní veterinární správa* [online]. [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/svs/portal/potraviny-s-chranenym-nazvem>
- [29] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 1*. 2. Tábor: OSSIS, 2002, 344 s. ISBN 80-86659-00-3.

- [30] NIELSEN, S. Food analysis: PH and titratable acidity. 4th ed. Dordrecht: Springer, c2010, xiv, 602 p. ISBN 978-1-4419-1477-4.
- [31] CHRISTIAN, G. D. Analytical chemistry. 5th ed. New York: John Wiley, 1994, 812 s. ISBN 04-715-9761-9.
- [32] SAMBROOK, Joseph.a David W. RUSSELL. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, c2001. ISBN 08-796-9576-5.
- [33] ĎURAČKOVÁ, Zdena. *Volné radikály a antioxidanty v medicíne (I)*. Bratislava: Slovak Academic Press, 1998. ISBN 80-88908-11-6.
- [34] OZGEN, Mustafa, JosephC SCHEERENS, NeilR REESE a RaymondA MILLER. Total phenolic, anthocyanin contents and antioxidant capacity of selected Elderberry (*Sambucus canadensis* L.) accessions. *Pharmacogn Mag.* [online]. 2010, (23), 198-203 [cit. 2016-04-29]. DOI: 10.4103/0973-1296.66936. ISBN 0.4103/0973-1296.66936. Dostupné z: <http://www.phcog.com/text.asp?2010/6/23/198/66936>
- [35] BALÍK, Josef. *Vinařství - návody do laboratorních cvičení*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003. ISBN 80-7157-317-5.
- [36] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-866-5903-8.
- [37] RITTICH, Bohuslav, Miroslav ŠPANO a Alena ŠPANOVÁ. *Molekulární identifikace a typizace bakterií mléčného kvašení s využitím shlukové analýzy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. ISBN 978-80-214-4853-7.
- [38] FIC, Vlastimil, Dagmar JAŠKOVÁ a Alois MASARYK. *Přírodní antioxidanty ve víně* [online]. [cit. 2016-05-17]. ISBN 80-86 690-31-08. Dostupné z: <http://www.cbks.cz/sbornik05b/Fic.pdf>

8 Seznam použité online literatury pro obrázky

- [39] Vinařské podoblasti oblasti Morava. MORAVIA VITIS S.R.O. *Moraviavitis.cz* [online]. ©2004-2011 [cit. 2015-10-04]. Dostupné z: <http://www.moraviavitis.cz/index.php?UrlQuery=0&value2=oblast-morava>
- [40] Výroba bílého vína. *Web2.mendelu* [online]. [cit. 2016-05-15]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1190&typ=html
- [41] Sklizeň a posklizňové zpracování hroznů. *Web2.mendelu* [online]. [cit. 2016-05-15]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1272&typ=html
- [42] Státní zemědělská a potravinářská inspekce. *Zvyšování cukernatosti* [online]. [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/default.aspx>
- [43] *Kyselina vinná* [online]. [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/>
- [44] *Malolaktická fermentace* [online]. [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: <http://www.vinicavino.sk/sk/technologie/malolakticka-fermentace/>
- [45] 2,4,6-TRICHLOROANISOLE. *Chemspider Search and share chemistry* [online]. [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6620.html>

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

DNA	deoxyribonukleové kyseliny
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
DPPH	(2,2-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl)
EtBr	ethidium bromid
° NM	stupně normovaného moštoměru
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)
PCR - RFLP	RFLP – Restriction fragment length polymorphism (Polymorfismus délky restrikčních fragmentů)
TBE	Trisborát EDTA pufr