

Mendelova univerzita v Brně
Zahradnická fakulta v Lednici

Vliv šíření na vznik sloučenin vázajících SO₂ ve víně

Diplomová práce

Vedoucí práce:

Ing. Michal Kumšta

Vypracoval:

Bc. Andrej Holka

Lednice 2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatel : **Bc. Andrej Holka**
Studijní program: Zahradnické inženýrství
Obor: Řízení zahradnických technologií
Název tématu: **Vliv síření na vznik sloučenin vázajících SO₂ ve víně**
Rozsah práce: 60 stran , grafy, tabulky, chromatogramy

Zásady pro vypracování:

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

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci: *Vliv šíření na vznik sloučenin vázajících SO₂ ve víně* vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

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

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

V Lednici dne:

.....

Pod'akovanie

Rád by som sa poďakoval vedúcemu mojej diplomovej práce Ing. Michalovi Kumštovi za jeho odborné vedenie, cenné rady a pripomienky pri jej písaní. Tiež by som sa chcel poďakovať mojim blízkym, ktorí ma po celý čas podporovali, hlavne mojej priateľke.

Obsah

1 Úvod.....	7
2 Cieľ práce.....	9
3 Literárny prehľad	10
3.1 Síra	10
3.2 Oxid siričitý	10
3.2.2 Tvorba oxidu siričitého kvasinkami	11
3.3 Vlastnosti oxidu siričitého	12
3.3.1 Antiseptický účinok	12
3.3.1.1 Fungicídne a fungistatické vlastnosti.....	12
3.3.1.2 Antibakteriálne vlastnosti	13
3.3.2 Antioxidačné vlastnosti.....	14
3.3.3 Ochrana proti oxidázam	14
3.3.4 Ochrana proti oxidácii	14
3.3.5 Väzba látok a organoleptické účinky	15
3.4 Formy oxidu siričitého vo víne	15
3.4.1 Voľný oxid siričitý	15
3.4.1.1 Vplyv pH.....	17
3.4.1.2 Vplyv alkoholu a teploty.....	17
3.4.2 Viazaný oxid siričitý	18
3.4.2.1 Väzba s acetaldehydom	21
3.4.2.2 Tvorba acetaldehydu.....	21
3.4.2.3 Degradácia acetaldehydu	22
3.4.2.4 Karbonylové kyseliny (Ketokyseliny)	22
3.4.2.5 Vplyv tiamínu	23
3.4.2.6 Acetoin a diacetyl	24
3.4.2.7 Tvorba kvasinkami	24
3.4.2.8 Tvorba baktériami.....	25
3.4.2.9 Sacharidy a ich deriváty.....	26
3.4.2.10 5-oxofruktóza a laktóny kyseliny glukónovej	26
3.4.2.11 Ďalšie látky	27
3.5 Vplyv SO ₂ na zdravie	27
3.5.1 Toxicita a maximálna odporúčaná dávka	27
3.5.2 Alergia na siričitany	28
3.5.3 Obmedzenie maximálneho množstva SO ₂ vo víne	28
3.6 Možnosti zníženia množstva oxidu siričitého vo víne.....	30
3.6.1 Zníženie obsahu acetaldehydu	30
3.6.2 Ochrana zahrievaním	30
3.6.3 Ochrana inertnou atmosférou.....	30
3.6.4 Použitie bentonitu	31
3.6.5 Prídavok tiamínu.....	31
3.6.6 Použitie kyseliny askorbovej	31
3.6.7 Kyselina sorbová.....	32
3.6.8 Dimetyldikarbonát (DMDC).....	32
3.6.9 Lyzozóm	33
3.6.10 Vyššie masné kyseliny.....	34
4 Metodika práce	36
4.1 Materiál	36
4.1.1 Lokalita	36
4.1.2 Odroda	36

4.2 Použité prípravky	37
4.2.1 Nutriferm arom - výživa a biologický regulátor kvasenia	37
4.2.2 Nutriferm advance - komplexná výživa pre kvasinky	37
4.2.3 Supersolfosol - tekutá síra	38
4.2.4 Vínne kvasinky - TOP 20	38
4.3 Pracovné postupy	39
4.3.1 Výroba mikrovzoriek vína	39
4.3.1.1 Dávkovanie oxidu siričitého	39
4.3.1.2 Aktivácia kvasiniek	40
4.4 Základné chemické analýzy muštu a vína	41
4.4.1 Stanovenie všetkých titrovateľných kyselín (EEC No 2676/90)	41
4.4.2 Stanovenie redukujúcich cukrov skrátenou metódou podľa Rebeleina	42
4.4.3 Stanovenie oxidu siričitého titrovaním odmerným roztokom jódu	43
4.4.4 Senzorické hodnotenie	44
4.4.5 ALPHA analyzér	45
4.4.6 HPLC analýza karbonylových zlúčenín vo víne	45
5 Výsledky	48
5.1 Stanovenie všetkých titrovateľných kyselín	48
5.2 Stanovenie redukujúcich cukrov	48
5.3 Stanovenie voľného a celkového oxidu siričitého	49
5.4 Senzorická analýza vína	52
5.5 Analýza vína na prístroji ALPHA	53
5.6 HPLC analýza karbonylových zlúčenín vo víne	56
6 Diskusia	63
7 Záver	65
8 Súhrn	66
9 Resumé	67
10 Literárne zdroje:	68
11 Zoznam obrázkov	72

1 Úvod

Vinárstvo a vinohradníctvo je v dnešnej dobe na vzostupe a víno obľubuje čoraz viac konzumentov. Možno za tým hľadať lepšiu ekonomickú situáciu obyvateľstva, ale svoju úlohu zohráva aj stúpajúca kvalita našich vín. Zákazník má na výber veľké množstvo rôznych druhov vína od stále sa zvyšujúceho počtu vinárstiev. Podstatné je, že nájsť kvalitné a chutné víno nie je v dnešnej dobe žiadny problém. Práve naopak, bez neho je ťažké sa presadiť vo zvyšujúcej sa konkurencii.

Oxid siričitý je ako látka s antimikrobiálnymi vlastnosťami používaná pri výrobe vína a jeho skladovaní už od čias starých Rimanov. Tí síce nevedeli analyticky stanoviť jeho účinky, ale naučili sa ho používať na základe pozitívnych skúseností. Neskôr, po storočiach používania, bolo zistené, že účinky oxidu siričitého nemusia byť len pozitívne a istú dobu bolo jeho používanie dokonca zakázané.

V dnešnej dobe je neoceniteľným pomocníkom a nie je objavená žiadna iná látka, ktorá by dokázala nahradiť jeho všestranné enologické účinky. S rozvojom vedy a technológie sa viaže vo všeobecnosti viac vedomostí, ktorými ľudstvo disponuje. Dnes vieme, že oxid siričitý je látkou, s ktorou sa viažu aj určité zdravotné riziká, preto existujú limity na jeho používanie, ktoré treba dodržiavať. Je stanovená istá hranica, ktorú by príjem tejto látky nemal prekročiť. Týchto skutočností si je vedomá aj veľká časť konzumentov, ktorá by sa v prípade negatívnej reklamy alebo nedobrych skúseností s vínom, mohla od producenta odvrátiť.

Rozvoj vedy nám umožnil skúmať a pochopiť aj vlastnosti a fungovanie oxidu siričitého vo víne a mušte. Iba malá časť oxidu siričitého, ktorý je do muštu alebo vína pridaný, nám zabezpečuje pretrvávajúcu ochranu. Omnoho väčšia časť je naviazaná na rôzne iné látky, a tým sú jej ochranné účinky blokované. Veľmi silná väzba vzniká s karbonylovými zlúčeninami, ktoré často vo víne viažu podstatnú časť oxidu siričitého. Preto je dôležité, aby sme pochopili princíp tvorby týchto zlúčenín a aby sme technologickými postupmi ich množstvo nezvyšovali, ale naopak znižovali. To bude viesť aj k nižšej potrebe používania oxidu siričitého. Niektoré tieto zlúčeniny sa nachádzajú v mušte a pochádzajú z hrozna. Ich množstvo dokážeme znížiť hlavne lepším zdravotným stavom hrozna, pretože sú často produktom metabolizmu plesní alebo baktérií.

Iné látky, ktoré sú tvorené pri alkoholovej fermentácii, ako napríklad acetaldehyd, neovplyvníme kvalitou hrozna. Môžeme iba nastaviť podmienky fermentácie tak, aby ich vznikalo čo najmenšie množstvo. Je to proces s veľkým množstvom vstupných a výstupných parametrov, pričom nie všetkým častiam ešte úplne rozumieme. Je preto

dôležité pochopiť, ako tieto látky vznikajú, aké sú ich účinky, interakcie s inými látkami a či sa vieme brániť pred ich nechceným účinkom.

Tiež nie nepodstatnou možnosťou znižovania obsahu oxidu siričitého vo víne je použitie látok, ktoré ho nahradzujú. Hoci žiadna z nich nenahradí všetky jeho účinky, a preto sa používajú len ako doplnok, niektoré z ich kombinácií sú lepším riešením ako samostatný oxid siričitý a jeho potrebnú dávku výrazne znižujú. Vedecký pokrok ide v dnešnej dobe dopredu míľovými krokmi a okrem hlbšieho skúmania ešte nevyjasnených skutočností je tu aj možnosť objavenia nových postupov a preparátov. Všetky nám známe vedomosti by mali viesť k tomu, aby sme vedeli konzumentom predložiť produkt čo najlepšej kvality, spĺňajúci tie najprísnejšie kritériá ohľadom možného účinku na ich zdravie.

2 Cieľ práce

Cieľom tejto diplomovej práce je preštudovať súčasný stav problematiky ohľadom vplyvu sírenia na vznik látok viažucich oxid siričitý vo víne. Zameriame sa hlavne na karbonylové zlúčeniny, pretože tieto látky často viažu najvýznamnejšie množstvo oxidu siričitého.

Pre rozbor vplyvu oxidu siričitého na tvorbu týchto látok, vyrobíme viacero mikrovzoriek vína. Podmienky, v ktorých bude alkoholová fermentácia prebiehať upravíme, pridaním odstupňovaných dávok oxidu siričitého a rôznych foriem doplnkovej výživy pre kvasinky, do muštu. Po ukončení alkoholickéj fermentácie pomocou HPLC analýzy stanovíme koncentráciu karbonylových zlúčenín vo víne. Získané hodnoty štatisticky spracujeme a vyhodnotíme.

3 Literárny prehľad

3.1 Síra

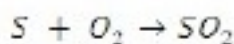
Síra je krehká kryštalická látka žltej farby. Patrí medzi nekovy. Je zlým vodičom tepla a elektrického prúdu. V prírode sa vyskytuje vo voľnej forme alebo v zlúčeninách, najčastejšie sulfidov (pyrit - FeS_2 , sfalerit - ZnS , galenit - PbS , chalkopyrit - CuFeS_2) a síranov (sadrovec - $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, baryt - BaSO_4 , Glauberova soľ - $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). V atmosfére sa nachádza ako sírovodík - H_2S a oxid siričitý - SO_2 . Tiež je významne zastúpená v rope a uhlí, spaľovaním ktorých sa dostáva do atmosféry. V 1 litri morskej vody sa nachádza asi 900 mg síry. Síra je biogénny prvok a je súčasťou aminokyselín metionín, cysteín a cystín.

Z chemického hľadiska je síra - 16S (Sulfur) prvok VI. A skupiny z periodickej tabuľky prvkov a radíme ju medzi chalkogény, takzvané rudotvorné prvky. Na valenčnej vrstve má 6 elektrónov, čiže môže byť až 6-väzbová. Oxidačné číslo môže dosahovať hodnoty II až -VI. Prírodná síra je tvorená 4 stabilnými izotopmi ^{32}S , ^{33}S , ^{34}S a ^{36}S (KAMENČÍK, 2009).

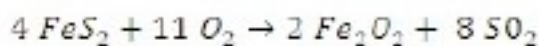
Síra sa získava ťažbou, pražením sulfidov alebo z technických plynov, kde je obsiahnutá vo forme H_2S .

3.2 Oxid siričitý

Oxid siričitý - SO_2 , je bezfarebný jedovatý ľahko skvapalniteľný plyn. Pri nízkych koncentráciách ho nie je cítiť, ale pri vysokých dávkach má dráždivý, štipľavý zápach. Vzniká spaľovaním síry alebo oxidačným pražením sulfidických rúd (POLÁČEK a kol., 2003).



Obrázok 1 Vznik SO_2 spaľovaním síry (POLÁČEK a kol., 2003)



Obrázok 2 Vznik SO_2 pražením pyritu (POLÁČEK a kol., 2003)

Oxid siričitý ľudia používajú už veľmi dlho. Homér (ktorého život sa uvádza do obdobia medzi 12. až 7. storočím p.n.l.) spomína spaľovanie síry na oxid siričitý kňazmi, ktorí ho používali na dezinfekciu pri náboženských obradoch. Podľa MICHLOVSKÉHO (2012) vedecké výskumy dokázali jeho používanie vo víne už v 7. storočí p. n. l.

Spaľovanie síry sa datuje až do rímskych čias a pretvalo do 15. storočia. Z tohto obdobia je rada cisárskych dekrétov, ktoré zakazovali použitie oxidu siričitého vo víne. Bolo to preto, že sa ho do vína už pridávalo príliš veľa a boli badateľné účinky presírenia. Dávky siričitanov vo víne mohli dosahovať až $1000 \text{ mg SO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$. Na zákaz použitia oxidu siričitého malo vplyv ochladenie v Európe. Vína mali vyšší obsah kyselín a vnímanie siričitanov bolo výraznejšie. Používanie oxidu siričitého bolo opätovne povolené cisárom Maximiliánom I. Boli však už definované limity použitia – 16 gramov na 1000 litrov vína. V priebehu 15. - 18. storočia, behom klimaticky chladného obdobia, boli vyrábané vína s výraznou aciditou, ktoré boli stabilné. Prišlo k upúšťaniu od používania SO_2 . Naproti tomu sa do vína na zníženie kyslosti pridával octan olovnatý. Víno bolo vďaka nemu zaguľatenejšie a menej náchylné na vznik chorôb. Vďaka tejto toxickej látke však trpela celá Európa a hlavne šľachta. Situácia bola taká zlá, že v roku 1696 vojvoda Wurttenberský vydal zákon, ktorý pridávanie olova do vína trestal smrťou. V modernom vinárstve sa používanie oxidu siričitého datuje od 18. storočia. Súvisí to s oteplením, nižšou aciditou vína a potrebou chrániť ho pred skazením a zvrhnutím. Na začiatku 20. storočia mu bolo pripisované zlepšenie kvality vína, pochádzajúceho z hrozna postihnutého hnilobou. To prispelo k obľúbenosti jeho používania. Jeho antimikrobiálne vlastnosti a ochrana, ktorú poskytuje proti bakteriálnej skaze, boli objavené až neskôr. Účinnosť molekulárneho SO_2 bola preukázaná až v polovici 20. storočia.

Dnes je veľmi ťažké predstaviť si výrobu vína bez použitia oxidu siričitého. Nie je to nemožné, dokonca ani zložité a takto urobené vína sú dostupné, ale chýbajúci oxid siričitý ovplyvňuje ich ďalší vývoj, mikrobiálnu stabilitu a životnosť. Oxid siričitý sa vyznačuje viacerými vlastnosťami, ktoré sú pre víno pozitívne. Negatívne môžeme jeho vplyv vnímať pri príliš vysokých dávkach či už z pohľadu vplyvu na samotné víno, alebo na zdravie človeka.

3.2.2 Tvorba oxidu siričitého kvasinkami

Nakoľko zrejme takmer každý, kto pracuje s vínom, hrozno alebo mušt pred kvasom zasírí, treba si uvedomiť, že oxid siričitý vo víne nie je čisto exogénna látka. Kvasinky sú schopné určité množstvo vytvoriť svojou vlastnou aktivitou. Vo všeobecnosti to je zriedkavo viac ako $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, ale v určitých prípadoch to môže byť viac ako $30 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a). WÜRDIG (in FARKAŠ, 1983) uvádza tiež hodnoty, ktoré s týmto korešpondujú. Ďalej uvádza, že kvasinky, ktoré produkujú SO_2 patria k druhom *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis* a *Saccharomyces bayanus*.

Oxid siričitý je produkovaný kvasinkami vďaka prítomnosti elementárnej síry,

sírnych aminokyselín, síranov a siričitanov v mušte. ESCHENBRUCH (in FARKAŠ, 1983) uvádza, že produkcia SO₂ súvisí so syntetizovaním sírnych aminokyselín metionínu a cysteínu kvasinkami. Sú kvasinky, ktoré dokážu produkovať až 100 mg SO₂·l⁻¹. Pre túto svoju schopnosť sa označujú ako kvasinky produkujúce SO₂. Produkcia SO₂ stúpa spolu s hodnotou pH. Napomáha jej aj ošetrovanie hrozna práškovou sírou a meďnatými prípravkami pri dozrievaní. Tiež ju ovplyvňuje aj obsah cukru v mušte.

3.3 Vlastnosti oxidu siričitého

3.3.1 Antiseptický účinok

Oxid siričitý inhibuje rozvoj mikroorganizmov (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006 b). Podľa jeho koncentrácie ich dokáže priamo zničiť alebo, pokiaľ koncentrácia nie je na ich zničenie dostatočná, môže ich iba dočasne inhibovať. Keď koncentrácia SO₂ klesne, príde opäť k deleniu buniek a rozvoju mikrobiálnej flóry (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a). Oxid siričitý má väčší vplyv na baktérie ako na kvasinky. Tieto organizmy majú voči nemu rôznu odolnosť. Apikulátne kvasinky *Kloeckera* a *Hanseniaspora* sú menej odolné ako *Sacharomyces cerevisiae* a baktérie mliečneho kvasenia *Oenococcus oeni* sú naň náchylnejšie ako rod *Lactobacillus* alebo *Pediococcus*.

Jedna z hlavných úloh, kvôli ktorým pri výrobe vína používame oxid siričitý, je snaha dostať do fermentačného procesu mušt bez nechcených kvasiniek a baktérií, ktoré by mohli mať nepriaznivý vplyv na sensoriku a vlastnosti budúceho vína. Takúto ochranu najviac potrebujú mušty, ktoré pochádzajú z hrozna napadnutého hnilobou a sprievodnou mikrofórou, sú bohaté na cukry, majú nízke pH a vysokú teplotu.

3.3.1.1 Fungicídne a fungistatické vlastnosti

Pokiaľ ide o kvasinky, tieto vlastnosti oxidu siričitého môžeme využiť už pred alkoholovou fermentáciou alebo na zastavenie kvasenia vín s ponechaným zbytkovým cukrom. Dôležité je aby sme oxid siričitý aplikovali v dostatočnej dávke, ktorá svojím fungicídnym účinkom zničí markantnú časť existujúcej populácie. Následne víno chráni proti opätovnému rozkvaseniu, keď svojím fungistatickým účinkom bráni rastu reziduálnej populácie (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a).

Čo sa týka sírenie pred alkoholovou fermentáciou, oxid siričitý v nižšej dávke svojimi fungistatickými účinkami oddiali rozmnožovanie kvasiniek, čo nám dáva čas na odkalenie muštu. Hlavne v južných krajinách to tiež využívajú na jeho schladenie. Po adaptácii sa kvasinky začnú rozmnožovať a prebehne alkoholová fermentácia aj bez potreby zakvasiť mušt aktívnymi suchými vínnymi kvasinkami (AVSK). Pri vyššej dávke SO₂ dosiahneme usmrtenie kvasiniek, ktoré pochádzali z vinohradu a inokulujeme mušt

zákvasom kmeňa kvasiniek, ktoré si zvolíme.

Na kvasinky má účinok iba voľný oxid siričitý, nie viazaný. Kvasinky preto vytvárajú látky, ktoré ho viažu, aby voľný oxid siričitý inaktivovali. ROMANO a SUZZI (in RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a) uvádzajú pôsobenie molekuly oxidu siričitého na kvasinky. Molekulárny oxid siričitý preniká do bunky buď aktívnym transportom, alebo prostou difúziou. Vzhľadom na pH vo vnútri bunky, musí mať formu HSO_3^- . Vo vnútri bunky reaguje so zložkami ako koenzýmy NAD, FAD, kofaktormi alebo s tiamínom. Toto má účinok na enzymatické systémy vo vnútri bunky a na nukleové kyseliny. Spolu s tým je zviazaný výrazný pokles ATP.

Tie isté autorky uvádzajú, že odolnosť kvasiniek voči rôznym formám oxidu siričitého závisí od kmeňa kvasiniek. Nie všetky sú rovnako odolné. Okrem toho si odolnosť dokážu vypestovať. Pokiaľ boli kvasinky v kontakte s SO_2 , voči ďalšej dávke už budú odolnejšie ako jedince toho istého kmeňa, ktoré v kontakte s SO_2 neboli. RIBÉREAU-GAYON a kol. (2006b), uvádzajú, že čo sa týka vplyvu oxidu siričitého na ich populáciu, dávka $30 \text{ mg voľného SO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ by mala po 30 dňoch spoľahlivo zničiť všetky prežívajúce bunky.

3.3.1.2 Antibakteriálne vlastnosti

Baktérie majú tak isto ako kvasinky rôznu odolnosť voči SO_2 . Veľké množstvo baktérií je eliminované už koncentráciou $5 \text{ mg SO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$. Na baktérie pôsobí aj oxid siričitý vo viazanej forme, ktorý je naviazaný na acetaldehyd alebo na kyselinu pyrohroznovú. Výskum ukázal, že dôvodom nie je možnosť, že by baktérie túto väzbu narušili, čím by sa oxid siričitý uvoľnil. Pôsobia na ne priamo kombinované molekuly. Ich aktivita je síce 5- až 10-krát nižšia ako aktivita voľného SO_2 , avšak nachádzajú sa vo víne v 5- až 10-násobne vyšších množstvách. Množstvo $5 \text{ mg viazaného SO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ dokáže eliminovať až 50 % populácie baktérií.

Najmenej odolné sú voči oxidu siričitému baktérie mliečneho kvasenia. Vzhľadom na ďalšie okolnosti môže dávka okolo $80 - 120 \text{ mg SO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ trvalo znemožniť jablčno-mliečnu fermentáciu (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a). Toto je potrebné mať na pamäti hlavne pri červených vínach, kde sa jablčno-mliečna fermentácia pri ich výrobe stala štandardom.

Naopak, veľmi odolné sú octové baktérie, ktoré sú schopné znášať veľmi vysoké dávky SO_2 . Tých sa najlepšie vyvarujeme tým, že víno neponechávame v kontakte so vzdušným kyslíkom. Treba si dávať pozor aj na okraje nádob a rozhranie hladiny vína, tam dochádza k problémom veľmi často.

3.3.2 Antioxidačné vlastnosti

Oxidácia muštu alebo vína prebieha dvomi spôsobmi. Buď ako oxidácia chemická, kedy sa rozpustený kyslík viaže na rôzne molekuly, alebo sú tieto molekuly oxidované oxidačnými enzýmami. S prvou možnosťou sa stretávame hlavne pri skladovaní a zrení vína, pretože tam už oxidázy nie sú aktívne. Proti druhej možnosti je dôležité chrániť najmä mušt, pretože ten je na tento druh oxidácie veľmi náchylný.

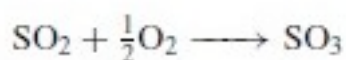
3.3.3 Ochrana proti oxidázam

V mušte je enzymatická oxidácia omnoho významnejšia ako chemická, z toho dôvodu, že prebieha veľmi rýchlo. V mušte z hrozna sa prirodzene vyskytujú 2 oxidázy – tyrozináza a lakáza, ktoré sú zodpovedné za oxidáciu muštu. Oxid siričitý tieto enzýmy inhibuje, alebo, v závislosti na dávke ničí a pred začatím alkoholovej fermentácie takto chráni mušt pred oxidáciou. Neskôr ochranu zabezpečuje reductívny charakter kvasenia. Avšak, pokiaľ v mušte a neskôr v mladom víne ostali aktívne oxidázy a nie je po dokvasení chránené SO₂, môže enzymatická oxidácia začať znovu prebiehať. Aby sme sa tomu vyhli, je vhodné dať si analyticky stanoviť aktivitu týchto oxidáz a v prípade potreby zasiahnuť oxidom siričitým.

Tyrozináza je oxidáza, ktorá sa bežne vyskytuje v bobuliach. Lakáza je produktom *Botrytis cinerea* a je omnoho aktívnejšia a stabilnejšia (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a). Je vylučovaná dovnútra bobule od začiatku rozvoja huby. V niektorých prípadoch môže byť preto jej množstvo značné. Preto je potrebná zvýšená dávka SO₂ pri bobuliach napadnutých hnilobou.

3.3.4 Ochrana proti oxidácii

Oxid siričitý sa v prítomnosti katalyzátorov viaže s rozpusteným kyslíkom. Toto viazanie kyslíka je veľmi pomalá reakcia, trvá mnoho hodín, až dní - podľa množstva kyslíka vo víne. Vyjadruje ju nasledujúca rovnica:



Obrázok 3 Rovnica popisujúca viazanie kyslíka s SO₂ (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a)

Antioxidačný účinok oxidu siričitého má najväčší význam pri skladovaní vína. Tiež prispieva k vytvoreniu dostatočne nízkeho oxido-redukčného potenciálu, pomáha vývoju chuti a zachováva arómu vína počas skladovania a zrenia (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a).

Kvôli svojej štruktúre vyžadujú biele vína vyššie dávky SO₂ na ochranu pred oxidáciou, ako vína červené (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006b). Riziko oxidácie

nastáva, keď hladina voľného oxidu siričitého poklesne u červeného vína pod 10 mg.l^{-1} , u bieleho pod 20 mg.l^{-1} a pod 30 mg.l^{-1} u vína vyrobeného z hrozna napadnutého hnilobou. Koncentrácie, ktoré chránia víno proti oxidácii, sú postačujúce na ochranu pred nežiadúcou mikroflórou, zároveň ale nemusia byť dostačujúce v prípade červeného vína ktoré nepodstúpilo malolaktickú fermentáciu. V prípade nízkej dávky voľného SO_2 tak k nej môže prísť počas skladovania.

Pri pokuse v syntetickom médiu, trvalo niekoľko dní, kým oxid siričitý naviazal na seba všetok kyslík z média (8 mg O_2 v 1 l – plne nasýtené médium). Táto oxidácia vyžaduje meďnaté a železité ióny ako katalyzátory (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a). Túto hypotézu potvrdili DUBERNET a kol. (in RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a). Ich experiment pozostával z použitia bieleho muštu nasýteného kyslíkom, kde elektrometricky sledovali, ako rýchlo sa kyslík stráca. Pri mušte bez použitia síry sa všetok kyslík stratil veľmi rýchlo, v priemere za 4 až 20 minút. V momente pridania SO_2 do média, spotreba kyslíka začala klesať a po pár minútach sa úplne zastavila. V prípade muštov z hrozna napadnutého hnilobou, bola doba, kým sa prestal spotrebovať kyslík, dlhšia.

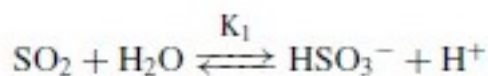
3.3.5 Väzba látok a organoleptické účinky

Z enologického hľadiska je reakcia SO_2 s inými látkami veľmi významná. V mušte a víne reaguje a viaže sa s mnohými zlúčeninami. Najvýznamnejšia je jeho väzba s acetaldehydom. Acetaldehyd dodáva vínu chuť oxidácie - zvetralého jablka. Tým, že sa s ním SO_2 viaže, chráni arómu vína a zároveň zlepšuje jeho chuť. Viac o tejto, ale aj iných väzbách, uvidíme neskôr.

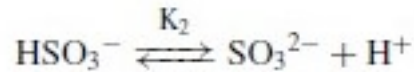
3.4 Formy oxidu siričitého vo víne

3.4.1 Voľný oxid siričitý

Po aplikácii oxidu siričitého v akejkoľvek forme do vodného roztoku dochádza k jeho rozpúšťaniu za vzniku kyseliny siričitej H_2SO_3 . Vplyvom pH dochádza k jej ionizácii na hydrogénsiričitanový (HSO_3^-) a siričitanový ión (SO_3^{2-}). Vo víne tiež ostáva časť molekulárneho oxidu siričitého ($\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Molekulárna forma najviac prevažuje pri pH 0 až 2, hydrogénsiričitanová pri pH 2 až 7 a siričitanová pri pH 7 až 10 (DIVOL a kol., 2012)



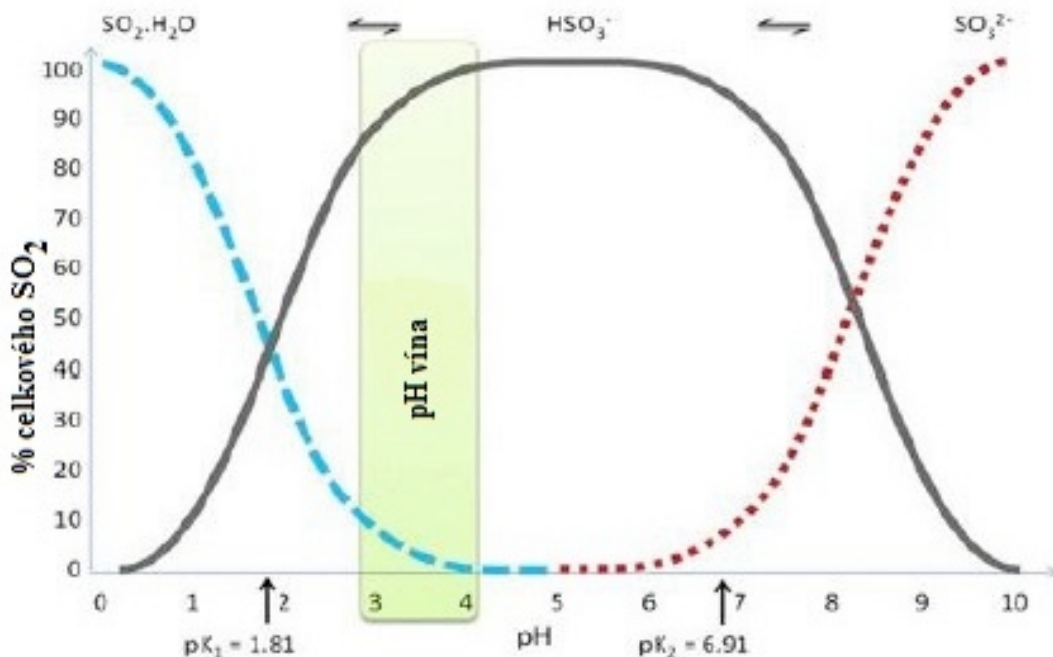
Obrázok 4 Rozpúšťanie oxidu siričitého za vzniku hydrogénsiričitanového iónu (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a)



Obrázok 5 Rozpúšťanie oxidu siričitého za vzniku siričitanové iónu (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a)

Kyselina siričitá má dve acidické funkcie, ktorých disociačné konštanty sú pri 20 °C, $K_1=1,81$ a $K_2=6,91$. Neutralizácia kyseliny začína pri $\text{pH} = \text{pK} - 2$. Z tohto dôvodu vo víne nie sú prítomné voľné siričitany SO_3^{2-} a kyselina siričitá je čiastočne neutralizovaná (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006). Dr. ALAN LIMMER (2006) označuje časť o neexistujúcom SO_3^{2-} vo víne za mýtus, ktorý sa postupom času podáva ako vedecký fakt. Je takisto množstvo literatúry, ktorej autori so siričitanovým iónom kalkulujú, hoci jeho množstvo vo víne je pri pH nižšom ako 3,9 menšie ako množstvo molekulárneho SO_2 (MURLI R. DHARMADHIKARI, 2006). Súvisí to s hodnotou disociačnej konštanty K_2 .

Väčšina voľného oxidu siričitého je vo forme HSO_3^- , iba jeho malá časť ostáva vo forme SO_2 . Hovoríme o nej ako o molekulárnom alebo aktívnom oxide siričitom a s touto časťou sa spájajú najdôležitejšie enologické vlastnosti „voľného“ oxidu siričitého. Táto forma je podľa výskumov antisepticky zrejme 20-násobne účinnejšia ako HSO_3^- . Ale podľa definície EU a OIV (Medzinárodná organizácia pre vinič a víno) je voľný oxid siričitý chápaný ako súčet H_2SO_3 , HSO_3^- a SO_3 (MICHLOVSKÝ, 2012). Voľný oxid siričitý priamo reaguje s jódou pri stanovení jodometrickou metódou.



Obrázok 6 Zobrazenie percentuálneho zastúpenia možných foriem SO_2 pri zmene pH . Vidíme zdôraznené pH vína a disociačné konštanty. (DIVOL a kol., 2012)

3.4.1.1 Vplyv pH

Z praktického hľadiska je veľmi dôležité vedieť pomer medzi molekulárnou sírou SO_2 a hydrogénsiričitanom HSO_3^- . Vieme ho jednoducho vypočítať za poznania pH a hodnoty disociačnej konštanty pK_1 podľa nasledujúceho vzorca:

$$\text{SO}_2 \text{ mol.} = \frac{100}{(10^{\text{pH}-pK_1} + 1)}$$

Obrázok 7 Vzorec na výpočet percentuálneho zastúpenia molekulárneho SO_2 vo víne (KRÄTSMÁR-ŠMOGROVIČ, 1994)

Na uľahčenie môžeme uviesť nasledujúcu tabuľku, ktorá hovorí o koncentrácii vzhľadom na pH vína. Je pri konštantnej teplote 20°C , pretože teplota rovnako ako pH tento pomer ovplyvňuje.

pH	Molekulárny SO_2	Ión HSO_3^-
3.00	6.06	94.94
3.10	4.88	95.12
3.20	3.91	96.09
3.30	3.13	96.87
3.40	2.51	97.49
3.50	2.00	98.00
3.60	1.60	98.40
3.70	1.27	98.73
3.80	1.01	98.99
3.90	0.81	99.19
4.00	0.64	99.36

Obrázok 8 Pomer medzi molekulárnym SO_2 a iónom HSO_3^- , vzhľadom na pH, pri teplote 20°C (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a)

Táto tabuľka je zároveň vysvetlením potreby zvýšených dávok oxidu siričitého pri vyššom pH vína. Tiež ale vysvetľuje aj to, prečo niektoré víno vyslovene páchne po „síre“, pričom dostalo rovnakú dávku SO_2 ako iné, nepáchnuce víno (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a).

3.4.1.2 Vplyv alkoholu a teploty

Alkohol aj teplota ovplyvňujú disociačnú konštantu kyseliny siričitej pozitívne. Stúpajúca teplota aj objemové percento alkoholu ju posúvajú k vyššiemu pH. Rovnako tak aj koncentrácia solí (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a).

alkohol (% vol.)	Teplota (°C)							
	19	22	25	28	31	34	37	40
0	1.78	1.85	2.00	2.14	2.25	2.31	2.37	2.48
5	1.88	1.96	2.11	2.24	2.34	2.40	2.47	2.56
10	1.98	2.06	2.21	2.34	2.44	2.50	2.57	2.66
15	2.08	2.16	2.31	2.45	2.54	2.61	2.67	2.76
20	2.18	2.26	2.41	2.55	2.64	2.72	2.78	2.86

Obrázok 9 Vplyv teploty a alkoholu na disociačnú konštantu pK_1 kyseliny siričitej (USSEGLIO-TOMASSET, 1995).

Účinok týchto dvoch faktorov spočítal a zhrnul do tabuľky USSEGLIO-TOMASSET (1996). Je vidieť že zastúpenie aktívneho SO_2 v pomere k HSO_3^- je alkoholom aj teplotou ovplyvňované pozitívne, stúpa spolu s týmito faktormi. Rozdiel v množstve voľného SO_2 vplyvom teploty môže byť až 20 mg.l^{-1} . Tento fenomén je napríklad možné využiť pri sterilizácii vína teplom, kedy nám vďaka zvýšeniu hladiny voľného SO_2 postačí teplota $45-50 \text{ }^\circ\text{C}$.

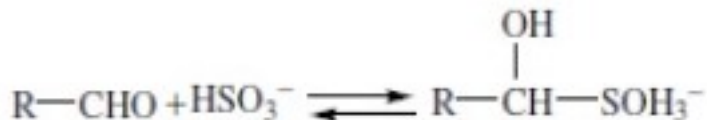
alkohol (% vol.)	Teplota (°C)		
	19	28	38
0	4.88		
10	7.36	15.40	27.55
20	10.95		

Obrázok 10 Vplyv alkoholu a teploty na percentuálne zastúpenie molekulárneho SO_2 (USSEGLIO-TOMASSET, 1995)

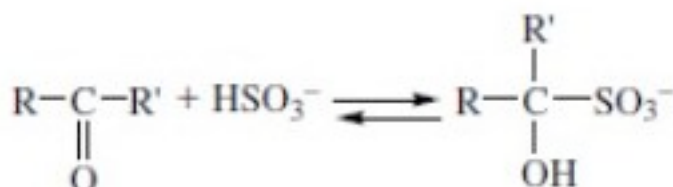
3.4.2 Viazaný oxid siričitý

Hydrogénsiričitanová a siričitanová forma SO_2 sú veľmi reaktívne a viažu sa s molekulami, ktoré majú karbonylovú skupinu. Látky s touto skupinou označujeme ako aldehydy, pokiaľ majú túto skupinu na konci reťazca, alebo ketóny, pokiaľ sa nachádza vo vnútri. Oxid siričitý, ktorý tvorí molekuly s týmito látkami, nie je dostupný pre ďalšie väzby, a preto ho označujeme ako viazaný. Na rozdiel od voľného oxidu siričitého nemá také výrazné enologické vlastnosti. Jeho vplyv na kvasinky a zamedzenie oxidácie je nulový, má však vplyv na baktérie. Účinok závisí aj od toho, s ktorou látkou sa viaže. Viazaný oxid siričitý spolu s voľným SO_2 tvoria objem celkového SO_2 vo víne. Viazaný oxid siričitý tvorí jeho podstatnejšiu časť (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a). To aký je medzi týmito zložkami pomer, ukazuje na kvalitu práce vinohradníka a vinára. Čím zdravšie je hrozno z vinice a lepšia hygiena a práca s muštom a vínom v podniku, tým

menšie dávky SO₂ do vína treba dodať (MICHLOVSKÝ, 2012).



Obrázok 11 : Schéma reakcie hydrogénsiričitanového iónu s aldehydom (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a)



Obrázok 12 Schéma reakcie hydrogénsiričitanového iónu s ketónom (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a)

Niektoré látky, ako napríklad acetaldehyd, sa viažu so sírou veľmi pevnou väzbou, táto väzba je prakticky po celý čas životnosti vína. Iné, naopak, majú túto väzbu slabú a po vyčerpaní molekulárneho SO₂ v médiu väzba zanikne a SO₂ prechádza do svojej voľnej formy.

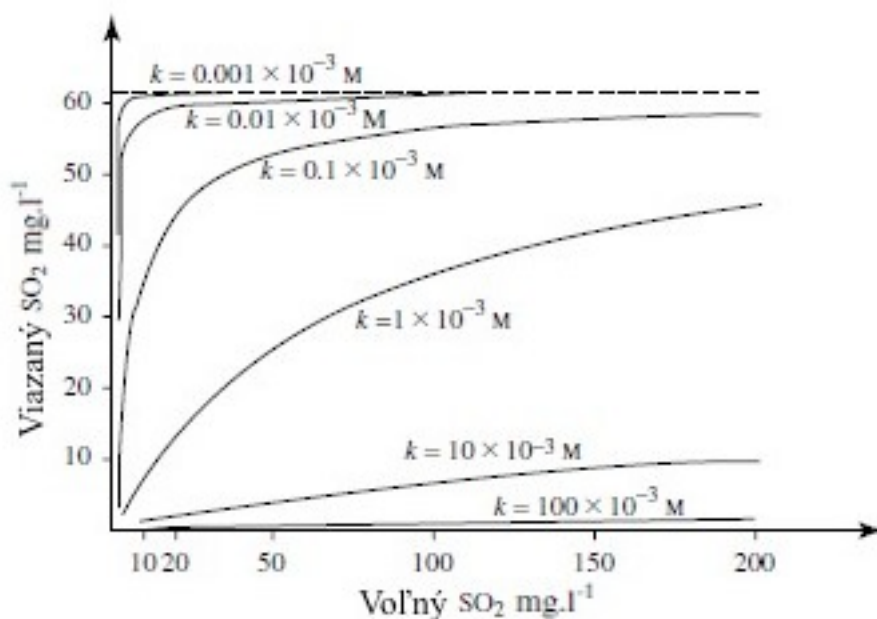
Veľmi dobre nám tento proces ukazuje obrázok č. 13. Celkový oxid siričitý máme rozdelený na 4 časti. V ľavej časti je najmenšie políčko tvorené molekulárnym SO₂. Jeho objem sa môže meniť podľa faktorov, ktoré ovplyvňujú jeho pomer k HSO₃⁻, ako pH, teplota atď. Na základe ich zmeny sa bude posúvať úsečka „a“, oddeľujúca ho od voľného HSO₃⁻, doľava alebo doprava. Voľný HSO₃⁻ oddeľuje úsečka „b“ od HSO₃⁻ viazaného na rôzne látky. Rovnováha medzi nimi je opäť pohyblivá. Viazaná forma môže prechádzať do voľnej a opačne v závislosti na mnohých podmienkach. V pravej časti je SO₂ naviazaná na acetaldehyd. Táto väzba je pevná a nemenná, SO₂ naň viazaný už bude naďalej iba v tejto forme. Samozrejme, pokiaľ by prichádzalo k ďalšej tvorbe acetaldehydu, bude sa toto množstvo zvyšovať, ale k jeho zníženiu nepríde (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a).



Obrázok 13 Zobrazenie vzťahu medzi jednotlivými zložkami oxidu siričitého v roztoku (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 1977)

To, že acetaldehyd tvorí väzbu s SO_2 pevnejšiu ako iné látky, je dané ionizačnou konštantou K , ktorá je pre každú látku špecifická. Vyjadruje rovnovážny pomer medzi viazanou a neviazanou formou látky v médiu. Ak hodnota K bude menšia ako $0.003 \times 10^{-3} \text{ M}$, vypovedá to o tom, že táto látka bude existovať 100-krát viac vo viazanej forme ako voľnej. V praxi to znamená, že látky s nízkou hodnotou K sa budú takmer bez zvyšku viazať s voľným oxidom siričitým a blokovať ho pred ďalším upotrebením. Voľný oxid siričitý môže existovať až vtedy, keď sú všetky častice látky naviazané. Dôležité je, že takáto väzba je definitívna, vyčerpanie voľného SO_2 oxidáciou nijako neovplyvní tento stav a nepríde k vyviazaniu SO_2 z tejto väzby.

Ak hodnota K bude väčšia ako $30 \times 10^{-3} \text{ M}$, naopak, bude existovať 100-krát viac voľných molekúl danej látky ako viazaných. Takáto väzba je slabá. Keď je voľný SO_2 vyčerpaný oxidáciou, prichádza k jej rozpadu a obnovuje sa voľný SO_2 , potrebný na zachovanie rovnováhy. Môžeme to vidieť na nasledujúcom obrázku, ktorý ukazuje, ako látka s $K = 0,001 \times 10^{-3} \text{ M}$ okamžite viaže oxid siričitý až do maximálnej miery nasýtenia ($64 \text{ mg SO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ pre acetaldehyd), až potom začína narastať hladina voľného SO_2 (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a).



Obrázok 14 Vplyv ionizačnej konštanty K na väzbu látok s SO_2 (BLOUIN, 1965)

3.4.2.1 Väzba s acetaldehydom

Acetaldehyd alebo inak etanal je veľmi často látkou, ktorá viaže najpodstatnejšiu časť SO_2 vo víne. Jeho hodnota K je extrémne nízka ($0,0024 \times 10^{-3} \text{ M}$) a tomu zodpovedá naviazanie vyše 99 percent molekúl s SO_2 za vytvorenia molekúl kyseliny acetaldehyd siričitej. Jeden mg acetaldehydu na seba naviaže 1,467 mg oxidu siričitého. Prítomnosť voľného acetaldehydu sa považuje za nemožnú vo víne, ktoré obsahuje voľný SO_2 . Avšak, bez prítomnosti voľného SO_2 , kyselina acetaldehyd siričitá uvoľňuje stopové množstvá acetaldehydu. O ňom sa hovorí, že je zodpovedný za plochosť vína.



Obrázok 15 Reakcia acetaldehydu s hydrogénsiričitanovým iónom za vzniku kyseliny acetaldehydsiričitej (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a)

Vytvorenie väzby acetaldehydu s oxidom siričitým je veľmi rýchle, do 90 minút po zasírení je naviazaných až 98 % molekúl, do 5 hodín sú naviazané všetky. Táto reakcia je nezávislá na teplote, jej zvýšenie uvoľní iba mizivú časť SO_2 (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a).

3.4.2.2 Tvorba acetaldehydu

Acetaldehyd je tvorený viacerými cestami, ale jeho hlavným zdrojom je alkoholová fermentácia. Je jej medziproduktom, vzniká debarboxyláciou kyseliny pyrohroznovej. Vyššie hodnoty sú pozorované, keď je v mušte voľný SO_2 . Pri vysokom zasírení muštu

môže jeho koncentrácia presiahnuť 100 mg.l⁻¹. Tvorba acetaldehydu a jeho väzba s SO₂ je spôsobom ako sa kvasinky chránia pred antiseptickými účinkami oxidu siričitého (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006b). Z tohto dôvodu nám všetok SO₂ pridaný do muštu pred kvasením zvyšuje hladinu viazanej „síry“. Takisto je zbytočné pridávať SO₂ do fermentujúceho muštu, kvasinky na to zareagujú tvorbou acetaldehydu a všetok ho veľmi rýchlo naviažu bez toho, aby mal nejaké účinky.

Pokiaľ sa snažíme zastaviť fermentáciu a ponechať vo víne vyššie množstvo cukru, je z tohto dôvodu vhodné pred pridaním SO₂ znížiť aktivitu kvasiniek napríklad podchladením, alebo znížiť ich množstvo filtráciou. Následne pridáme dávku SO₂ v dostatočnom množstve, aby sme aktivitu kvasiniek zastavili.

Veľké množstvo acetaldehydu a následne veľký objem celkového SO₂ majú aj vína, v ktorých prebehla viacnásobná fermentácia, pretože kvôli tomu boli viackrát sírené a všetok tento objem SO₂ prešiel do viazanej formy..

Ďalšou možnosťou vzniku acetaldehydu je chemická oxidácia etanolu počas skladovania vína. Pokiaľ je vyčerpaný všetok voľný SO₂, už malé množstvo nenaviazaného acetaldehydu víno ovplyvňuje a robí ho „plochým“. Stačí pridať malé množstvo SO₂, aby sa acetadehyd naviazal. Takto sa ale zvyšuje koncentrácia viazaného SO₂.

Zdrojom acetaldehydu môže byť hrozno napadnuté hnilobou. Jeho koncentrácia v takomto mušte sa pohybuje okolo 10 mg.l⁻¹, maximálne až do výšky 20 mg.l⁻¹. Pri sírení tohto muštu by sme mali vopred rátať s tým, že istá časť SO₂ nám okamžite prejde do viazanej formy (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a).

3.4.2.3 Degradácia acetaldehydu

OSBORNE a kol. (2000) vo svojom výskume zistili, že niektoré kmene *Oenococca oeni* a *Lactobacilla* (z ktorých 7 je bežne komerčne dostupných) počas malolaktickej fermentácie degradujú acetaldehyd na kyselinu octovú a alkohol. Boli degradované obidve formy acetaldehydu, voľná aj viazaná s SO₂. Voľná forma bola spotrebovaná vo väčšom množstve zrejme preto, že SO₂ uvoľňovaný pri degradácii viazanej formy pôsobil antisepticky. Ukázalo sa, že miera degradácie je kmeňovo daná.

3.4.2.4 Karbonylové kyseliny (Ketokyseliny)

Tieto kyseliny sú karboxylovými kyselinami, ktoré majú okrem -COOH skupiny aj -C=O skupinu. Podľa vzájomnej kompozície týchto dvoch skupín nám vznikajú alfa alebo beta-ketokyseliny. Zahrievaním alfa-ketokyseliny prichádzajú o CO skupinu a beta-ketokyseliny sú dekarboxylované. Ako sme spomenuli vyššie, hydrogénsiričitanová

a siričitánová forma SO₂ sa viažu na látky s touto skupinou.

Z hľadiska väzby s oxidom siričitým majú neopomenuteľný význam kyselina pyrohroznová a kyselina 2-oxoglutárová (predtým alfa-ketoglutarová). Rovnako ako acetaldehyd majú veľmi nízku disociačnú konštantu K ($0,3 \times 10^{-3}$ M pre kys. pyrohroznovú a $0,5 \times 10^{-3}$ M pre kys. 2-oxoglutárovú) a tvoria s oxidom siričitým veľmi silné väzby. Množstvo nimi viazaného oxidu siričitého môže byť veľmi významné. Napríklad víno s obsahom 200 mg kyseliny pyrohroznovej a 100 mg kyseliny 2-oxoglutárovej má 93 mg SO₂.l⁻¹ viazaných na tieto zlúčeniny pri 20 mg voľného SO₂.l⁻¹. Tieto látky sa v rôznych vínach viažu s veľmi rozdielnymi množstvami SO₂. V priemere sa s SO₂ viaže 20,7 % kyseliny pyrohroznovej a 16,7 % kyseliny 2-oxoglutárovej (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a). Ich množstvo vo víne je veľmi premenlivé, ale môže dosahovať až hodnôt 500 mg.l⁻¹ kys. pyrohroznovej a 350 mg.l⁻¹ kys. 2-oxoglutárovej (USSEGLIO-TOMASSET, 1995).

Z týchto dôvodov je pre nás žiaduce pochopiť tvorbu týchto látok vo víne. Sú tvorené počas alkoholovej fermentácie. Po počiatočnom nahromadení týchto látok ich koncentrácia klesá s končiacou fermentáciou (BARBE a kol., 2000). V sladkých vínach, kde došlo k zastaveniu fermentácie, je preto ich koncentrácia vyššia ako vo vínach suchých. Ich tvorba je pozitívne podporovaná faktormi, ako vyššia teplota, vyššie pH, prevzdušnenie muštu. Naopak, negatívne ich tvorbu ovplyvňuje tiamín (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a).

3.4.2.5 Vplyv tiamínu

Kyselina pyrohroznová vzniká pri glyceropyruvátovej fermentácii, pričom môže byť substrátom pre tvorbu ďalších látok, alebo je medziproduktom pri alkoholovej fermentácii. Pri alkoholovej fermentácii je následne dekarboxylovaná na acetaldehyd a ten je premenený na alkohol. Dekarboxylácia prebehne za pomoci pyruvát dekarboxylázy a kofaktorom reakcie je tiamín pyrofosfát (TPP). Tiamín, alebo aj vitamín B₁, je jeho prekurzorom. Je predpoklad, že nedostatok tiamínu vedie k častejšiemu neuskutočneniu tejto reakcie a akumulácii kyseliny pyrohroznovej. Vyčerpanie tiamínu v mušte súvisí s rozvoj divokých kvasiniek, zrejme s ich vyššou spotrebou tejto látky (UGLIANO a HENSCHKE in MORENO-ARRIBAS a POLO, 2009). Okrem toho môže k jeho nedostatku prísť vplyvom SO₂, ktorý tiamín rozkladá, alebo v prípade botrytického hrozna. Prídavok tiamínu v dávke 0,5 mg.l⁻¹, prispel v sladkých vínach k priemernému zvýšeniu koncentrácie voľného SO₂ o 20 mg.l⁻¹. Na to, aby tento postup účinkoval, treba tiamín pridať do vyčíreného a zasíreného muštu dostatočne skoro pred začatím fermentácie. Zároveň treba zdôrazniť, že účinok tiamínu bol preukázaný iba v muštoch zo zdravého

hrozna, v prípadoch nahnilého hrozna sa neprejavil (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a).

S akumuláciou kyseliny pyrohroznovej súvisia aj iné látky, je totiž substrátom pre vznik acetoínu a diacetylu. Tieto majú karbonylové skupiny a takisto sa viažu s SO₂. V anaeróbných podmienkach vzniká z kyseliny pyrohroznovej v Krebsovom cykle kyselina 2-oxoglutarová.

3.4.2.6 Acetoin a diacetyl

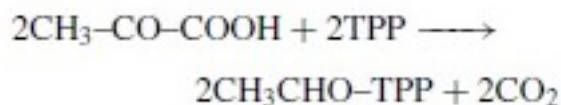
Acetoin a diacetyl (alebo aj 2,3-butándión) sú látky, ktoré spolu úzko súvisia. Sú to takisto karbonylové (diacetyl má až 2 karbonylové skupiny) zlúčeniny a viažu sa s SO₂. Pre acetoin aj diacetyl je typická maslová vôňa. Sensoricky môžeme acetoin spozorovať až zhruba od 150 mg.l⁻¹. Diacetyl je aromatickejší. Môžeme ho cítiť zhruba od 2 mg.l⁻¹. Nižšie dávky (2-5 mg.l⁻¹), prispievajú k plnosti vína, ale vyššie koncentrácie 8 mg.l⁻¹ sú už sensorickou vadou (MICHLOVSKÝ, 2014). V koncentrácii do 5 mg.l⁻¹ ho môžeme cítiť ako príjemný lieskový oriešok, nad túto hranicu už je to maslovosť. Acetoin sa vo víne bežne vyskytuje v množstve okolo 10g.l⁻¹, diacetyl 1g.l⁻¹. V červenom víne býva ich koncentrácia vyššia ako v bielom (VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009). Tieto dve látky môžu byť produkované kvasinkami aj baktériami mliečneho kvasenia. Koncentrácia diacetylu je najvyššia na konci alkoholovej fermentácie a na konci jablčno mliečného kvasenia, neskôr klesá. Samozrejme ju znižuje aj viazanie sa s SO₂.

3.4.2.7 Tvorba kvasinkami

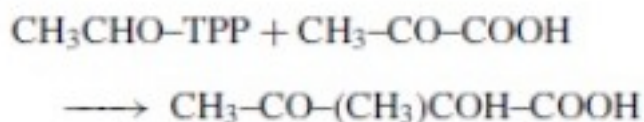
Reakcia začína kondenzáciou dvoch molekúl kyseliny pyrohroznovej za prítomnosti tiamín-pyrofosfátu (TPP) a za vzniku aktívneho acetaldehydu (CH₃CHO-TPP). Následne z aktívneho acetaldehydu a ďalšej molekuly kyseliny pyrohroznovej vzniká acetolaktát (kyselina acetomliečna). Jeho oxidatívna dekarboxylácia produkuje diacetyl. Neoxidatívna forma dekarboxylácie vedie ku vzniku acetoínu (ZAMORA in MORENO-ARRIBAS a POLO, 2009). Táto reakcia prebieha od začatia alkoholovej fermentácie. Po jej skončení je aj diacetyl ktorý sa vytvoril, rýchlo redukovaný na acetoin, alebo až na 2,3-butándiol. Držanie vína na kvasničných kaloch a na kaloch baktérií podporuje túto redukciu (SWINGS in RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a).

Ďalší mechanizmus vzniku je reakcia aktívneho acetaldehydu s acetylkoenzýmom A za vzniku diacetylu. Niektoré kvasinky nedokážu ísť touto cestou, pretože nemajú aktívny enzým diacetyl syntetázu. Diacetyl je následne redukovaný na acetoín pomocou enzýmu diacetyl reductáza. Tá má najvyššiu aktivitu pri pH 7, pri nízkom pH jej výkon rapidne klesá.

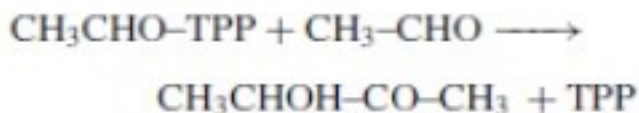
Tretia cesta vzniku acetoínu je priamo kondenzáciou molekuly aktívneho acetaldehydu a voľného acetaldehydu.



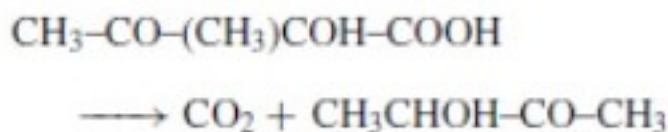
Obrázok 16 Vznik aktívneho acetaldehydu (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a)



Obrázok 17 Vznik acetolaktátu (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a)



Obrázok 18 Vznik acetoínu reakciou acetaldehydu s aktívnym acetaldehydom (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a)



Obrázok 19 Vznik acetoínu dekarboxyláciou acetolaktátu (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a)

Koncentrácia diacetylu a acetoínu vyprodukovaných pri alkoholovej fermentácii je nízka a nedosahuje takú úroveň, aby sme ich sensoricky vnímali. Väčšina z kmeňov *Saccharomyces cerevisiae* produkuje nízke množstvá (do 12 mg.l⁻¹) acetoínu. Enormné množstvá produkujú kmene *Kloeckera apiculata* a *Hanseniaspora guilliermondii*, v priemere 100 až 200 mg.l⁻¹ (ROMANO a SUZZI, 1996). Kvasinky tiež produkujú diacetyl pri metabolizovaní aminokyselín počas alkoholovej fermentácie. Takisto sa vďaka diacetylreduktáze premieňa na acetoín (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a).

3.4.2.8 Tvorba baktériami

Acetoín aj diacetyl môžu byť tvorené viacerými druhmi baktérií a z rôznych substrátov. Jedna je degradácia kyseliny citrónovej baktériami mliečneho kvasenia. Mliečne baktérie ho týmto spôsobom vedia vytvoriť v omnoho väčšom množstve ako kvasinky. Sú predpokladané dve cesty. Jedna je reakcia acetylkoenzýmu A s aktívnym acetaldehydom katalyzovaná diacetylsyntázou. Túto sa však doposiaľ nepodarilo izolovať.

Druhá cesta produkuje acetoín dekarboxyláciou z acetolaktátu. Jeho oxidáciou môže u baktérií mliečneho kvasenia vznikajú diacetyl. Pri octových baktériách nebola táto oxidácia doteraz preukázaná (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a). Na množstvo syntetizovaných látok majú vplyv podmienky malolaktickej fermentácie, množstvo degradovanej kyseliny citrónovej a aj druh *Oenococca*.

Acetoín môže byť tiež produkovaný octovými baktériami z kyseliny mliečnej. Produkujú ho aj baktérie z rodu *Enterobacteriaceae* pri fermentácii glukózy (KRATOCHVIL, 2013).

3.4.2.9 Sacharidy a ich deriváty

Najčastejšie cukry vyskytujúce sa v mušte sú glukóza a fruktóza, ktoré sú pri alkoholovej fermentácii premenené na alkohol. Okrem nich však mušt obsahuje mnoho ďalších sacharidov, či už skvasiteľných, alebo neskvasiteľných. Tieto sa často viažu do oligomérov. Môžu sa viazať spolu viaceré molekuly sacharidov, alebo sa viažu sacharidy s inými látkami. Najčastejšie sú väzby medzi sacharidmi a fenolickými zlúčeninami a medzi sacharidmi a monoterpénmi (MORENO a PEINADO, 2012). Mnohé molekuly sacharidov sa vyznačujú karbonylovou skupinou, či už v aldehydickej, alebo ketonickej forme, preto môžeme dôvodne predpokladať, že sa budú viazať aj s oxidom siričitým. LAHO, MINÁRIK a NAVARA (1970), tvrdia, že napríklad fruktóza s SO_2 nereaguje. Iné reagujú, ale zase sú v mušte a víne zastúpené v malom množstve. Napríklad 1 g arabinózy sa viaže s 8 mg $\text{SO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ pri 50 mg voľného, ale koncentrácia arabinózy vo víne neprevyšuje 1 g.l⁻¹. Opačným príkladom je glukóza. 1 g.l⁻¹ glukózy viaže iba 0,3 mg $\text{SO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ pri 50 mg.l⁻¹ voľného SO_2 avšak vyskytuje sa v muštoch vo veľkom množstve. Dá sa ňou vysvetliť určitý pokles voľného SO_2 pri šírení hrozna alebo muštu (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a).

3.4.2.10 5-oxofruktóza a laktóny kyseliny glukónovej

Vo výskume z roku 2002, BARBE a kol. zistili, že v muštoch, ktoré pochádzajú z botrytického hrozna, sú v dôsledku ich pH závažným reaktantom s SO_2 5-oxofruktóza a 2 laktóny kyseliny glukónovej - gamma a delta-glukonolaktón. Vznikajú pri vnútrobunkovej esterifikácii kyseliny. V takýchto muštoch sa kyselina glukónová nachádza v koncentráciách okolo 20 g.l⁻¹ a jej gamma a delta laktóny predstavujú spolu zhruba 10 % jej koncentrácie. Ich afinita (disociačná konštanta $K=4,22 \times 10^{-3}$ M) k SO_2 zodpovedá afinite monokarbonylových zlúčenín a pri obsahu voľného SO_2 50 mg.l⁻¹ sú schopné pravdepodobne viazať až 135 mg $\text{SO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$.

5-oxofruktóza sa v mušte z hrozna napadnutého hnilobou nachádza rádovo

v stovkách mg na liter. Spolu s koncentráciou sa zvyšuje jej väzobná sila voči SO₂. 5-oxofruktóza môže byť zodpovedná až za naviazanie vyše 70 % SO₂ (BARBE in RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a). Jej koncentrácia nie je ovplyvnená alkoholovou fermentáciou ani inou činnosťou kvasiniek, môžeme ju regulovať iba zdravotným stavom hrozna. Je produkovaná z fruktózy octovými baktériami z rodu *Gluconobacter*. Najhoršie sú prípady, keď hniloba napadne bobule hrozna, keď sú už zrelé, vtedy sa 5-oxofruktóza podieľa na viazaní SO₂ v priemere 60 percentami.

3.4.2.11 Ďalšie látky

V mušte z hrozna napadnutého hnilobou boli identifikované glyoxal a metylglyoxal, zlúčeniny s 2 karbonylovými skupinami (GUILLOU-LARGETEAU in RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a). Pravdepodobne ich tvorí *Botrytis cinerea* alebo mikroorganizmy pridružené na napadnutom hrozne. Glyoxal k viazaniu SO₂ kvôli nízkej koncentrácii nijak závažne neprispieva, ale metylglyoxal môže v mušte viazať až 50 mg.l⁻¹ SO₂ pri hladine 50 mg voľného. Jeho koncentrácia výrazne klesá pri alkoholovej fermentácii, preto nie je zodpovedný za viazanie signifikantného množstva SO₂ vo víne.

Je množstvo ďalších látok, ktoré sa vo víne alebo v mušte v malých množstvách viažu s SO₂, ako napríklad kyseliny galakturónová, glukurónová, oxaloctová, glyoxalová, prípadne metylglyoxal a iné. Množstvo SO₂ ktoré jednotlivo viažu, je vo väčšine prípadov zanedbateľné, ale vyskytujú sa aj opačné prípady. Napríklad 100 mg.l⁻¹ dihydroxyacetónu na seba viaže zhruba 16 mg.l⁻¹ SO₂ pri 50 mg voľného SO₂. Ale vyskytli sa prípady, kedy táto hodnota dosahovala až 72 mg viazaného SO₂ (BARBE a kol. in RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a).

3.5 Vplyv SO₂ na zdravie

Okrem nežiadúceho organoleptického pôsobenia vyšších dávok SO₂ je jeho vplyv na zdravie človeka závažným dôvodom na obmedzenie jeho koncentrácie vo víne. Hoci jeho toxicita nebola vedecky preukázaná, znižovanie jeho nadmerne vysokých dávok sa zaviedlo už v stredoveku a v tomto smere sa pokračuje dodnes. V 20. storočí sa už viedlo mnoho výskumov, ktoré sledovali toxicitu SO₂.

3.5.1 Toxicita a maximálna odporúčaná dávka

Samozrejme, najprv výskum musel prebehnúť na zvieratách. Skúmala sa ako akútna, tak aj chronická toxicita. Zistilo sa, že jednorazové požitie vyššej dávky je mierne toxické. V závislosti od druhu zvierat LD50 (smrteľná dávka pre 50 % jedincov testovenej populácie) je medzi 0,7 - 2,5 g na 1 kg živej hmotnosti zvierat'a. Podľa týchto výsledkov by bola toxicita siričitanu sodného (Na₂SO₃) na úrovni produktov ako sóda bikarbóna

alebo horká soľ.

Chronická toxicita sa skúmala dlhodobejšie (TIL a kol. in RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a). Zvieratám bola počas niekoľkých generácií podávaná dávka 1,5 g SO₂ na 1 kg hmotnosti. Vyskytovali sa 3 druhy porúch. Spomalený rast, histopatologická zmena žalúdka a nedostatok tiamínu. Tento výskum viedol k stanoveniu maximálnej netoxickej hodnoty u potkanov na 72 mg na 1 kg hmotnosti. Svetová zdravotnícka organizácia podľa tejto hodnoty stanovila odporúčanú dennú dávku (RDA – recommended daily allowance) na 0,7 mg na 1 kg hmotnosti človeka.

Vzhľadom na dodržanie tejto odporúčanej dávky jej neprekročeniu zodpovedá konzumácia približne 0,44 l vína s celkovým obsahom SO₂ 80 mg.l⁻¹ pre osobu o hmotnosti 50 kg a 0,79 l tohto vína pre osobu s hmotnosťou 90 kg. Pokiaľ by sme vychádzali z maximálnej povolenej dávky SO₂ pre suché biele vína 200 mg SO₂ na liter, klesla by nám odporúčaná dávka pre osobu s hmotnosťou 50 kg na 0,17 l a pre osobu s hmotnosťou 90 kg na 0,32 l vína.

Čo sa týka výskumu na ľuďoch, príznaky otravy ako nevoľnosť a zvracanie sa dostavili až po podaní 4 gramov siričitanu sodného, čo je vysoká dávka. Podávanie dávky 400 mg Na₂SO₃ po dobu 25 dní nemalo žiaden efekt. U ľudí sa toxicita siričitanov pripisuje deštrukcii tiamínu, ale bolo preukázané, že prostredie s pH 2, ktoré je v žalúdku, má na túto reakciu veľmi obmedzujúci dopad (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a).

3.5.2 Alergia na siričitany

V roku 1973 bolo vedecky dokázané, že existuje alergická reakcia na siričitany. Postihuje človeka už pri malej dávke, ako je 1 mg a sú ňou postihnutí väčšinou astmatici. Lekárska veda im pitie vína z tohto dôvodu neodporúča. Aj z tohto dôvodu je oxid siričitý zaradený medzi alergény a legislatíva vyžaduje na etikete fľaše upozornenie, že víno obsahuje siričitany alebo oxid siričitý, pokiaľ je jeho koncentrácia vyššia ako 10 mg.l⁻¹. V Európskej únii toto pravidlo deklaruje smernica 2000/13/ES z roku 2000, ale napríklad USA ho zaviedli už v roku 1988.

Medzi alergény, takzvané éčka patria: E220 - oxid siričitý, E221 - siričitan sodný, E222 - hydrogénsiričitan sodný, E223 - disiričitan sodný, E224 - disiričitan draselný, E225 - siričitan draselný, E226 - siričitan vápenatý, E227 - hydrogénsiričitan draselný a E228 - hydrogénsiričitan vápenatý. Všetky slúžia ako antioxidanty a konzervanty.

3.5.3 Obmedzenie maximálneho množstva SO₂ vo víne

Vzhľadom na vyššie uvedené čísla a normy Svetovej zdravotníckej organizácie môže byť víno pre ľudský organizmus zdrojom podstatného množstva oxidu siričitého. Je

preto pochopiteľné, že sa stále hľadajú cesty na zníženie noriem pre jeho použitie. Momentálne platia pre nás ako krajinu Európskej únie obmedzenia vychádzajúce z európskej legislatívy pre maximálny obsah SO₂ vo víne.

A: Pre obsah oxidu siričitého vo víne platí:

1. Celkový obsah oxidu siričitého v iných vínach ako sú šumivé vína a likérové vína nesmie v čase ich uvedenia na trh na priamu ľudskú spotrebu presiahnuť

a) 150 mg.l⁻¹ pre červené vína,

b) 200 mg.l⁻¹ pre biele a ružové vína.

2. Odchýlne od odseku 1 písmena a) a písmena b) v prípade zvyškového cukru viac ako 5 gramov na liter platí, že nesmie presiahnuť v čase ich uvedenia na trh na priamu ľudskú spotrebu:

a) 200 mg.l⁻¹ celkového SO₂ pre červené vína,

b) 250 mg.l⁻¹ celkového SO₂ pre biele a ružové vína,

c) 300 mg.l⁻¹ celkového SO₂ pre Spätlese, pozdní zber, neskorý zber, Tokajské samorodné atď.

(Nariadenie konkrétne vymenúva všetky oblasti a vína z nich, ktoré do tejto kategórie spadajú, ale pre účel tejto práce nie je podstatné ich sem všetky uvádzať, je možné si daný dokument vyhľadať)

d) 350 mg.l⁻¹ celkového SO₂ pre Auslese, výber z hrozna, výber z hroznů atď (platí poznámka ako v prípade bodu 2.c).

e) 400 mg.l⁻¹ celkového SO₂ pre Eiswein, Auschbruch, bobuľový výber, hrozienukový výber, cibébový výber, slamové víno, ľadové víno atď.

B: Pre likérové vína platí, že celkový obsah oxidu siričitého nesmie presiahnuť v čase ich uvedenia na trh na priamu ľudskú spotrebu

a) 150 mg.l⁻¹, ak je obsah zbytkového cukru nižší ako 5 gramov,

b) 200 mg.l⁻¹, ak je obsah zbytkového cukru najmenej 5 gramov.

C: Pre šumivé vína platí, že celkový obsah oxidu siričitého nesmie presiahnuť v čase ich uvedenia na trh na priamu ľudskú spotrebu

a) 185 mg.l⁻¹ v prípade všetkých kategórií akostných šumivých vín,

b) 235 mg.l⁻¹ v prípade ostatných šumivých vín (Nariadenie rady ES č 606/2009).

Tieto hodnoty sú hraničné pre maximálne limity, ale väčšina vín ich nedosahuje. Nebolo to tak vždy, napríklad v roku 1926 vo Francúzsku legislatíva povoľovala až 450 mg celkového SO₂.l⁻¹. V súčasnej dobe sme však vďaka pokročilejšej vede a jej poznatkom a ochrane vinohradov pred hubovými chorobami pred takýmito vysokými dávkami uchránení, hoci niektoré krajiny stále nemajú zákonné obmedzenie maximálneho

množstva oxidu siričitého vo víne.

3.6 Možnosti zníženia množstva oxidu siričitého vo víne

Oxid siričitý sa zdá pre výrobu kvalitného vína a jeho ochranu pred vplyvmi, ktoré by mu mohli škodiť nevyhnutelný. Avšak vzhľadom na ľudské zdravie a legislatívu, nie je možnosť jeho použitia neobmedzená. Kým pre uchovanie vlastností vína potrebujeme mať oxid siričitý v molekulárnej forme, vplyv na ľudské zdravie je hodnotený z hľadiska celkového SO₂ vo víne. Vplyvom skutočností, ktoré nemôže vinár ovplyvniť, ako napríklad zlý ročník, silný tlak chorôb, alebo vysoké pH muštu, sa môže stať, že sú potrebné vyššie dávky oxidu siričitého, ako by sme vo víne chceli mať. Je preto vhodné poznať technologické postupy, alebo chemické prípravky, ktoré môžu jeho úlohu zastúpiť a obmedziť jeho dávky.

3.6.1 Zníženie obsahu acetaldehydu

Množstvo tejto látky, ktorá viaže SO₂ veľmi pevne a núti nás kvôli potrebnému aktívnemu SO₂ aplikovať ďalšie dávky, môžeme znížiť zvolením kmeňa kvasiniek s jeho nízkou produkciou. V dnešnej dobe je to tiež jedno z kritérií, na ktoré sa prihliada pri sledovaní vhodnosti kmeňa kvasiniek. Takto je možné znížiť obsah acetaldehydu až o 40 %. Treba mať na pamäti, že všetok SO₂ pridaný do muštu pred kvasením budeme mať neskôr viazaný s acetaldehydom ako kyselinu acetaldehydsiričitú.

3.6.2 Ochrana zahrievaním

Zahrievanie muštu nám znižuje počet kolónií baktérií aj kvasiniek a dôležitá je aj inaktivácia oxidačných enzýmov. Tieto skutočnosti majú súvis s dávkou SO₂ do muštu, ktorá môže byť nižšia. Tiež sa využíva zahriatie vína na teplotu 45-48 °C. Má to význam pred jeho fľašovaním, dávka SO₂ potrebná na jeho ochranu je nižšia, pretože vyššia teplota znamená jej lepší účinok. Následne je potrebné aby sa predišlo akejkoľvek nožnej kontaminácii vína, čiže prostredie aj zariadenia, ktoré s ním budú v styku musia byť sterilné. Zahrievanie má však aj svoje nevýhody. Jednak je to finančná náročnosť takejto operácie a jednak možné ovplyvnenie chute vína.

3.6.3 Ochrana inertnou atmosférou

Za základ ochrany vína obmedzením jeho kontaktu s kyslíkom môžeme považovať nerezové tanky s plávajúcím vekom. Pri odobratí vína veko klesne spolu s hladinou. Slabou stránkou tohto riešenia sú tesnenia. Pokiaľ udržiavame víno vo veľkých nádobách a potrebujeme z neho častejšie odoberať, je pre nás vhodné vyplniť prázdne miesto iných plynom ako kyslíkom. Ako inertné plyny sú povolené oxid uhličitý (CO₂), argón (Ar)

a dusík (N). Argón sa používa veľmi zriedka, pretože je drahý. Dusík vykazuje veľmi dobré účinky, vína pod jeho ochranou sa vyvíjali rovnako ako tie v plnej nádobe, ich chuť a zrenie neboli ovplyvnené. Aj keď nám víno pred oxidáciou chráni veľmi dobre, neposkytuje nám žiadnu ochranu proti mikrobiálnej kontaminácii (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a).

Na ochranu pred oxidáciou boli vyskúšané aj účinky CO₂. V uzavretom tanku s muštom ním bol nahradený kyslík, čím sa zabránilo oxidácii. Celý proces kvasenia prebiehal reduktívne. Avšak po tom, ako bolo následné víno vystavené vplyvu kyslíka, začalo veľmi rýchlo oxidovať, zrejme pod vplyvom oxidačných enzýmov. Aj vinári majú overenú skúsenosť, že čím viac bol mušt chránený pred oxidáciou, tým viac je neskôr k vplyvom kyslíka náchylnejšie víno. Zdá sa, že tento spôsob by bol prijateľný iba pre určité (reduktívne) typy vín, prípadne v kombinácii s prípravkom, ktorý zlikviduje oxidačné enzýmy. Nevýhodou CO₂ je aj jeho rozpustnosť vo víne. Jeho dávky nie je možné dopĺňať neustále, pretože na množstvo rozpusteného CO₂ vo víne sú zákonné limity.

3.6.4 Použitie bentonitu

Použitie bentonitu, by mohla byť práve metóda, ktorá by bola dopĺňajúca k inertnej atmosfére, ako bolo spomenuté. Bentonit totiž adsorbuje nielen polyfenoly, ktoré spôsobujú hnednutie vína, ale rovnako adsorbuje aj časť oxidačných enzýmov.

3.6.5 Prídavok tiamínu

Tiamín podporuje rast a tvorbu biomasy kvasiniek. Jeho použitie znižuje tvorbu karbonylových zlúčenín kyseliny pyrohroznovej a kyseliny 2-oxoglutárovej, ktoré sa viažu s SO₂. Tiamín sa pridáva vo forme tiamínhydrochloridu. Používa sa v dávke 0,6 mg.l⁻¹ a je potrebné pridať ho do muštu pred kvasením (FURDÍKOVÁ a MALÍK, 2007).

3.6.6 Použitie kyseliny askorbovej

Kyselina askorbová je všeobecne známa pod názvom vitamín C a bežne nachádza v zelenine a ovocí. V mušte z hrozna sa nachádza v dávke zhruba 50 mg.l⁻¹. Stráca sa oxidáciou a vo víne sa takmer nevyskytuje.

Kyselina askorbová je antioxidačné činidlo. Jej reakcia s kyslíkom je veľmi rýchla, katalyzovaná jónmi železa a medi. Táto reakcia nás zároveň chráni pred neskorším železitým zákalom, ktorý by sa mohol vo víne prejaviť ako vada. Zároveň nás ale nechráni pred oxidačnými enzýmami, na ochranu bieleho muštu je vhodné použiť ju spolu s oxidom siričitým. Ideálne je voliť takú dávku, aby viazala kyslík kým nezačne alkoholová fermentácia (BAROŇ, 2013).

Kyselina askorbová môže pri vyššom obsahu kyslíka oxidovať za vzniku peroxidu vodíka. Peroxid vodíka oxiduje kyselinu siričitú, ale aj iné zložky vína aj tie, ktoré by kyslíkom oxidované neboli. Kyselina askorbová neochráni víno pred dlhodobým pôsobením kyslíka tak dobre ako SO₂, napr. pri zrení v sudoch. Je vhodné ju použiť aj vtedy, keď už príde len k malej aerácii vína, napríklad pred fľašovaním.

Kyselina askorbová sa používa v dávkach 50-100 mg.l⁻¹, vyššia dávka by mohla negatívne ovplyvniť chuť (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a). Inak pôsobí z organoleptického hľadiska pozitívne hlavne na mladé, svieže vína s ovocným, prípadne citrusovým charakterom. Zvlášť pozitívny účinok má na Sauvignon blanc, Ryzlink rýnsky a Veltlínske zelené. Nemá žiadny organoleptický vplyv na vína, ktoré zrejú v sude.

3.6.7 Kyselina sorbová

Použitie kyseliny sorbovej alebo jej soli sorbanou draselného pôsobí fungicídne rovnako ako SO₂. Nevýhodou je, že sa tieto účinky neviažu s antibakteriálnymi, tie nemá kyselina sorbová takmer žiadne. Vplyv kyseliny sorbovej je ovplyvnený hladinou pH - čím nižšie pH, tým lepší účinok. Pozitívne ju ovplyvňuje aj hladina alkoholu vo víne. Je vhodné ju kombinovať s SO₂, ktorý aj v nízkych dávkach vyvažuje jej neúčinnosť voči baktériám. Voľný SO₂ je tiež potrebný na viazanie karbonylových zlúčenín. Už 30-40 mg.l⁻¹ kyseliny sorbovej je postačujúca dávka na ochranu proti fermentácii (MICHLOVSKÝ, 2012). Jej použitie je zákonom limitované iba pre vína ktoré obsahujú redukujúce cukry. Tieto chráni pred refermentáciou, nemá využitie pre suché vína. Limit pre použitie kyseliny sorbovej je 200 mg.l⁻¹. V niektorých krajinách, napr. v Rakúsku nie je povolená.

Kyselina sorbová je zdrojom uhlíka pre mliečne baktérie. Ak dôjde k výraznejšiemu nárastu ich populácie, môže byť metabolizovaná na krotonaldehyd (STEIDL, 2010). Ten spôsobuje vôňu po pelargóniách, čo je vada vína. Môžeme ju cítiť aj pri zriedení látky 1 : 10 miliardám (EDER a kol., 2006). Z tohto dôvodu sa kyselina sorbová nepoužíva pre vína, ktoré budú podstupovať malolaktickú fermentáciu.

3.6.8 Dimetyldikarbonát (DMDC)

Táto látka výborne pôsobí na mikrobiologickú stabilitu vína. Je výrazne účinný proti kvasinkám. Jeho výhodou je, že je ešte účinnejší proti *Brettanomyces* (postačuje dávka 150 mg.l⁻¹) ako proti *Saccharomyces cerevisiae* (250 mg.l⁻¹). Ďalšou výhodou je, že maximálny možný účinok nastáva krátko po pridaní DMDC (THRELFALL a MORRIS, 2002), preto by mal byť používaný nie ako preventívny, ale ako kuratívny prostriedok, proti nechcenej kontaminácii kvasiniek v mušte alebo víne. Následne môžeme mušť

inokulovať zvoleným kmeňom kvasiniek. Tiež je vhodné použiť ho pred fľašovaním vína, nakoľko usmrť, nielen inaktivuje, zostávajúce kvasinky. Spolu s ním je potrebné pridať SO₂, ktorý bude víno chrániť proti oxidácii.

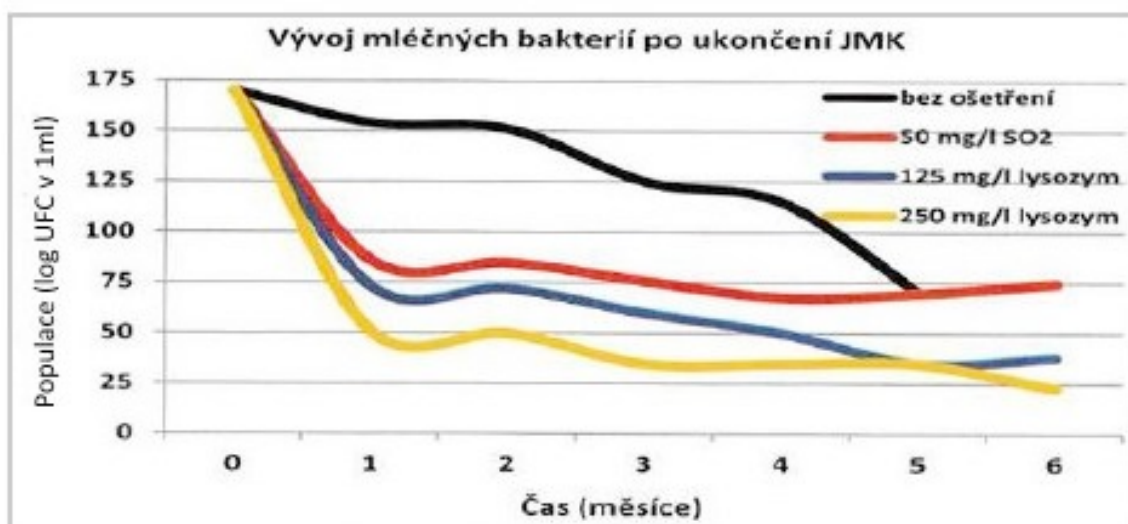
Je tiež dobré použiť ho pri zastavovaní kvasenia muštov z botrytického hrozna, kedy sú často používané enormné dávky SO₂, aj to niekedy bezvýsledne. SO₂ totiž na rozdiel od dimetyldikarbonátu kvasinky neusmrť. Je účinnejší proti čistým kultúram kvasiniek (DIVOL a kol., 2005). Pri spontánnej fermentácii týchto muštov, vykazuje nižšiu účinnosť. Je vhodné ho použiť ako prídavok k SO₂, nie ako jeho náhradu (BAROŇ, 2013). Antibakteriálne účinky dimetylkarbonátu nie sú také výrazné ako antifungicídne, ale môžeme ich brať do úvahy. Populácia väčšiny divokých kmeňov baktérií je jeho maximálnou možnou dávkou 200 mg.l⁻¹ ovplyvnená. Mliečne a octové baktérie sú voči nemu odolné, neusmrť ich ani dávka 300 mg.l⁻¹. Až 500 mg.l⁻¹ malo účinok a dokázalo zastaviť jablčno-mliečnu fermentáciu (COSTA a kol., 2008).

Dimetyldikarbonát je toxická látka, pri manipulácii s ním sa treba chrániť pred stykom s pokožkou a pred výparmi. Takisto pri jeho odbúravaní vzniká metanol a oxid uhličitý, ale ani pri maximálnej povolenej koncentrácii jeho množstvo (96 mg.l⁻¹) nepredstavuje nebezpečenstvo pre ľudské zdravie.

3.6.9 Lyzozóm

Lyzozóm je enzým extrahovaný z vaječného bielka. Je bielkovinovej povahy, zložený celkom zo 125 aminokyselín. Jeho najcennejšia enologická vlastnosť je, že dokáže rozpúšťať steny mliečnych (grampozitívnych) baktérií. Na gramnegatívne baktérie, ako sú octové, neúčinkuje. Takisto nemá žiadne účinky na kvasinky. Na rozdiel od SO₂, jeho aktivita stúpa so zvyšujúcim sa pH.

Hoci je maximálna povolená dávka až 500 mg.l⁻¹, už prídanie 4 mg.l⁻¹ nám zabezpečí zničenie väčšiny mliečnych baktérií do 24 hodín. Lyzozóm pôsobí takmer okamžite. Jeho následné odstránenie z vína je zabezpečené samovoľným vyzrážaním po inaktivácii, alebo pomocou bentonitu.



Obrázok 20 Vplyv dávky lyzozómu na rozvoj mliečnych baktérií po jablčno-mliečnej fermentácii (MICHLOVSKÝ, 2012)

Lyzozóm je vhodný na použitie pre vína, ktoré chceme chrániť pred malolaktickou fermentáciou. Treba však treba spolu s ním použiť určitú dávku SO₂ proti oxidácii vína. Takisto sa používa na ošetrenie červených vín, po ukončení malolaktickej fermentácie zamedzí ďalšiemu rozvoju mliečnych baktérií. Možnosť jeho využitia sa naskytá aj pri komplikovaných fermentáciách, keď mušt stále obsahuje zbytkový cukor, ale intenzita alkoholovej fermentácie je nízka a mohlo by prísť k nežiadúcemu rozvoju baktérií. V týchto prípadoch je jeho použitie omnoho výhodnejšie oproti SO₂. Ten by bol rýchlo naviazaný na acetaldehyd a nevykázal by požadovanú aktivitu (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a).

Zo sensorického hľadiska lyzozóm víno negatívne neovplyvňuje, dokonca vína ním ošetrené sú lepšie. V porovnaní s vínami neošetrenými obsahujú menej prchavých kyselín a biogénnych amínov. Lyzozóm má drobné nevýhody. Jednou z nich je vysoká cena, vďaka ktorej nie je až natoľko používaný. Víno ním ošetrené môže byť náchylnejšie na tvorbu bielkovinových zákalov. V neposlednom rade, je tu možnosť alergickej reakcie zákazníkov na vajcia a výrobky z nich, kvôli čomu musíme fľašu označiť piktogramom.

3.6.10 Vyššie mastné kyseliny

Tieto vyššie nasýtené monokarboxylové kyseliny sú bežne vytvárané kvasinkami počas fermentácie. Bolo zistené, že ovplyvňujú samotný priebeh fermentácie. Kyseliny s dlhším reťazcom (C₁₆ a C₁₈) aktivujú kvasenie, kratšie (C₆ – kys. hexánová, C₈ – kys. oktánová a C₁₀ – kys. dekánová) pôsobia fungicídne a sťažujú ho, až úplne zastavujú. Výskum sa zameril na ich použitie pri zastavovaní fermentácie.

Ešte nie je objavený presný mechanizmus ich pôsobenia, ale predpokladá sa, že

vstupujú do bunky pasívnou fúziou cez bunkové steny, kde sú rozpúšťané. Toto spôsobuje modifikácie v bunkovej stene, ktorá má zvýšenú permeabilitu, a tým pádom ovplyvňuje celé fungovanie bunky. Táto mení svoj metabolizmus, nedokáže ďalej spracovávať cukry na alkohol a hynie. Mastné kyseliny je vhodné použiť spolu s SO₂, pričom výrazne znižujú jeho potrebnú dávku. Ich prídavok by nemal presiahnuť 10 mg.l⁻¹. Treba ich pridať 24 hodín pred zamýšľaným sírením. Následne pridaný SO₂ spôsobí až takmer úplnú inhibíciu kvasiniek (BAROŇ a BÁBIKOVÁ, 2011). Takto ošetrované vína vykazujú vysokú stabilitu.

Použitie vyšších mastných kyselín víno zo sensorického hľadiska negatívne neovplyvňuje, čo bolo dokázané viacerými sensorickými analýzami. Väčšina mastných kyselín je kvasinkami adsorbovaná a asimilovaná. Táto časť ostane viazaná v bunkovej stene a neskôr je z vína odstránená spolu s mŕtvymi telami kvasiniek. Iba veľmi malá časť mastných kyselín je esterifikovaná. Vo víne sa ich prídanie prejaví iba ako o pár mg.l⁻¹ zvýšená koncentrácia látky, ktorá je v ňom prirodzene (BAROŇ, 2009).

4 Metodika práce

4.1 Materiál

4.1.1 Lokalita

Hrozno na výrobu vína pochádza z malokarpatskej vinohradníckej oblasti, z pezinského rajónu z vinohradníckej obce Chorvátsky Grob. Vinica, z ktorej hrozno na výrobu vína pochádza, leží na pahorkatine, juhovýchodne od Malých Karpát v nadmorskej výške asi 140 m nad morom. Pôda vo vinici je hnedá, hlinito-piesočnatá. Priemerná ročná teplota je tu 10 °C, dĺžka slnečného svitu okolo 2100 hodín, suma aktívnych teplôt počas vegetácie je viac ako 3000 °C. Ročný úhrn zrážok je 750 mm.

4.1.2 Odroda

Na výrobu ružového vína sme použili hrozno z odrody Cabernet Sauvignon. Táto odroda je pravdepodobne náhodným krížencom odrôd Cabernet franc a Sauvignon blanc. Za jej pravlasť sa považuje oblasť Bordeaux. Tam je jednou zo základných odrôd na výrobu svetových červených vín a rozšírila sa odtiaľto do celého sveta. Okrem Európy sa pestuje aj v USA, Mexiku, Čile, JAR, Austrálii. Jeho výsadby vo svete tvoria 40000 ha, plus v samotnom Francúzsku sa pestuje na ploche 23000 ha. U nás nebol príliš rozšírený, ale v poslednej dobe sa jeho výsadba zvýšila. V súčasnosti je vysadený na približne 600 ha, čo je 3,2 % z celkovej výsadby (HRONSKÝ, 2014). Pre jeho neskoré vyzrievanie hrozna sa u nás veľmi často spracúva na ružové vína.

Charakteristika odrody:

List je stredne veľký, 5 laločnatý, s hlbokými výkrojmi, na spodnej strane jemne chlpkatý. Stonka je stredne dlhá, naružovelej farby. Bazálny výkroj je uzavretý, s okrúhlym alebo trojuholníkovým presvitom.

Strapec je stredne veľký, 120-150 mm dlhý, kužeľovitý, niekedy s krídelkami. Jeho priemerná hmotnosť je 118 g. Býva stredne hustý, niekedy redší, má sklon spríchať.

Bobula je stredná až malá, guľatá, tmavomodrej farby, s voskovým povlakom. Šupka je stredne pevná, dužina je mäkšej konzistencie, s typickou odrodovou chuťou (SOTOLÁŘ, 2006).

Odroda nie je náročná na polohu, ale vzhľadom na neskoré termíny dozrievania, patrí do teplejších oblastí. Podľa dostupných údajov najkvalitnejšie vína poskytuje na ľahších pôdach, samozrejme pri redukcii úrody. Do všetkých svojich fenofáz vstupuje Cabernet Sauvignon neskoro. Hrozno dozrieva v druhej polovici októbra. Plodnosť je 8-9 t.ha⁻¹, pri plodných klonoch až 14 t.ha⁻¹. Cukornatosť muštu býva 18-21 kg.hl⁻¹,

s obsahom kyselín 8 - 12 g.l⁻¹. Je odolný voči zimným mrazom a keďže neskoro raší, väčšinou nie je postihnutý jarnými mrazíkmi. Cabernet Sauvignon je veľmi citlivý na múčnatku viniča a menej citlivý na perenosporu. Jeho veľkým kladom je odolnosť voči šedej hnilobe, vďaka čomu môže ostať dozrievať vo vinohrade do neskorej jesene. Kvalita vína závisí od veľkosti úrody. Vo víne môžeme cítiť fialky, čierne ríbezle či zelenú papriku. Je veľmi bohaté na tanín a antokyany. Mladé červené víno pôsobí drsne, je vhodné jeho hrubosť okresať vyzrievaním v sudoch (POSPÍŠILOVÁ, 2005).

4.2 Použité prípravky

4.2.1 Nutriferm arom - výživa a biologický regulátor kvasenia.

Vlastnosti: Prípravok z tiel kvasiniek so zvýšeným obsahom aminokyselín a tiamínu.

Vzhľad: béžový prášok s ľahkou kvasnicovou vôňou.

Základné charakteristiky: Voľné aminokyseliny sú najdôležitejším stavebným prvkom pre kvasinky. Predstavujú prekursorov ktoré kvasinky využívajú na syntézu látok, ako sú vyššie alkoholy, estery, aldehydy, ktoré sa podieľajú na tvorbe arómy. Preto je dôležité obohacovať mušty voľnými aminokyselinami, čím zvýšime aromatickú intenzitu a komplexnosť vína. Nutriferm arom je prípravok vyrobený z tiel kvasiniek bohatých na voľné aminokyseliny, steroly a dlhé reťazce nenasýtených mastných kyselín - látok dôležitých pre životaschopnosť kvasiniek a pre dobrý priebeh fermentácie. Metabolizmus kvasiniek transformuje aminokyseliny na aromatické látky a vznikajú vína bohaté na arómu, intenzívne a komplexné. Nutriferm arom tiež predchádza vzniku sírnych zlúčenín, ktoré vznikajú pri nedostatku dusíka.

Dávkovanie: 30 g.hl⁻¹, maximálna povolená dávka (EU) 40 g.hl⁻¹.

Návod na použitie: prípravok sa rozpustí v malom množstve vody alebo muštu. Pridá sa do celého objemu muštu zároveň s kvasinkami pred začiatkom kvasenia.

Skladovanie: Prípravok treba skladovať na suchom, chladnom a dobre vetranom mieste. Otvorené balenia musia byť starostlivo uzavreté.

4.2.2 Nutriferm advance - komplexná výživa pre kvasinky.

Vlastnosti: bunkové steny kvasiniek, diamonium fosfát (DAP) a celulóza.

Vzhľad: béžový prášok s ľahkou kvasnicovou vôňou.

Základné charakteristiky: Nutriferm advance poskytuje v priebehu kvasenia dusík proteínom transportujúcim cukry a udržuje ich životnú aktivitu po celú dobu alkoholovej fermentácie. Doplnený dusík pochádza z DAP a z aminokyselín uvoľnených z bunkových stien kvasiniek. Dodáva tiež lipidy obsiahnuté v bunkových stenách kvasiniek. Lipidy posilňujú bunkové steny kvasiniek a tie sú potom omnoho viac odolné voči vysokému

obsahu alkoholu. Nutriferm advance je tiež doplnkom bunkových stien a celulózy, ktoré majú synergický detoxikačný účinok. Absorbujú reťazce mastných kyselín známých svojim inhibičným účinkom na kvasinky.

Dávkovanie: 20 až 40 g.h⁻¹ podľa podmienok (zrelosť, teplota, kmeň kvasiniek). Zákonné obmedzenie EU 75 g.h⁻¹.

Návod na použitie: rozpustiť v malom množstve vody. Pridať do muštu pred začiatkom kvasenia a dôkladne premiešať. Pri zastavení kvasenia pridať produkt v priebehu pretáčania. Pridaním môže vzniknúť pena, ktorá je normálna pri prídavku pevného materiálu v priebehu kvasenia.

Skladovanie: Skladovať na suchom, chladnom a dobre vetranom mieste. Otvorené balenia je treba poriadne uzavrieť.

4.2.3 Supersolfosol - tekutá síra

Vlastnosti: 40 % roztok hydrogénsiričitanu amónneho na sírenie muštov, vína a nápojov.

Použitie: vhodný ako antioxidant na udržanie reduktívneho stavu vín, antibakteriálne a protiplesňové činidlo.

Dávkovanie: 10 ml.h⁻¹ poskytuje 40 mg SO₂.l⁻¹ a 113 mg.l⁻¹ NH₄.

Návod na použitie: pridáme na hrozno v priebehu mletia alebo k už pomletej homogenizovanej hmote.

Skladovanie: v chladnom a suchom prostredí, otvorené balenie uzatvorte, chráňte pred deťmi.

4.2.4 Víne kvasinky - TOP 20

Základné charakteristiky: Saccharomyces cerevisiae, Enartis Selektion s vynikajúcimi schopnosťami presadiť sa proti prirodzenej mikroflóre. Optimálna teplota kvasenia 12-24 °C, dobrý priebeh kvasenia, stredná spotreba živín, pre mladé, svieže ovocné červené vína. Tolerancia alkoholu do 16 % objemu a tolerancia normálneho množstva SO₂ v mušte.

Technologické vlastnosti: tvorba prchavých kyselín menšia ako 0,3 g.l⁻¹ v mušte s potenciálnym alkoholom 12 % obj. Dobrá produkcia glycerolu. Znižujú kyselinu jablčnú (až 30 %). S primeranou výživou produkujú estery, ktoré zvyšujú odrodový charakter.

Návod na použitie: Kvasinky pomaly rozmiešať v 10-násobnom množstve vody a muštu, v pomere 1:1, pri teplote cca 35–38 °C. Nechať stáť cca 20–30 minút, pred pridaním do muštu opäť premiešať. Teplotný rozdiel medzi suspenziou a muštom nesmie byť väčší ako 8 °C. Následne treba kvasinky rozmiešať v celom objeme muštu alebo rmutu.

Dávkovanie: 20-40 g.h⁻¹, vyššie dávkovanie použiť iba v prípade nekvalitného hrozna alebo v prípade zlého mikrobiologického stavu.

Skladovanie: originálne zabalené pri izbovej teplote si udrží garantované vlastnosti po dobu 3 rokov. Skladovanie produktu v chladnom prostredí predlžuje jeho životnosť. Skladovanie dlhšiu dobu pri teplote vyššej ako 35 °C alebo vo vlhkom prostredí znižuje jeho účinnosť.

4.3 Pracovné postupy

4.3.1 Výroba mikrovzoriek vína

Vinica, z ktorej hrozno pochádza, má vek asi 25 rokov. Úroda nebola redukovaná. Zber úrody prebehol ručne dňa 15.10.2014, do nachystaných prepraviek s objemom 40 l. Hrozno nebolo úplne zdravé. Pomer bobúl napadnutých hnilobou vzhľadom na veľmi zlý vinársky rok nebol vysoký (do 10 %), avšak veľa hrozna malo zavädnutú strapinu a bobule boli nevyzreté a kyslé. Z tohto dôvodu bolo hrozno ručne prebraté a na výrobu vína sa použili iba vyzreté bobule. Po celodennej prebierke bolo hrozno pomleté na ručnom mlynkoodstopkovači a ešte v ten večer bolo vylisované. Cukornatosť muštu bola zameraná československým normovaným muštomerom a dosiahla 20,5 °NM. Mušt nebol dosladzovaný. Vďaka nočnému chladu mohol byť mušt počas noci odkalený statickou sedimentáciou bez toho aby sa bez použitia SO₂ rozkvasil.

Následne bola z odkaleného muštu odobratá dávka 24 l, ktorá bola rozdelená do 6 plastových nádob s objemom 5 litrov. Do každej nádoby bola starostlivo odmeraná dávka 3,9 l muštu. Zostávajúcich 0,6 l muštu bolo ponechaných na prípravu zákvasu z ASVK. Nádoby boli označené nápisom VZ1 – vzorka 1.

Ďalších 24 l muštu bolo pred rozdelením ošetrených prípravkom Nutriferm arom v dávke 7,2 g, čo zodpovedá 30 g.hl⁻¹. Následne bol mušt tiež rozdelený do šiestich 5-litrových nádob v dávke 3,9 l a zvyšok sme ponechali na vytvorenie zákvasu. Nádoby boli označené ako VZ2 – vzorka 2.

Posledná dávka 24 l muštu bola ošetrená rovnako ako vzorka 2, použili sme prípravok Nutriferm advance v rovnakej dávke. Po následnom rovnakom rozdistribuovaní muštu do nádob sme ich označili ako VZ3 – vzorka 3.

4.3.1.1 Dávkovanie oxidu siričitého

Pre tento pokus sme si stanovili vyrobiť víno z muštu zasíreného pred začatím alkoholovej fermentácie v dávkach 0, 30, 60, 90, 120 a 150 mg SO₂.l⁻¹. Nami použitý prípravok síry obsahuje v dávke 10 ml.hl⁻¹ 40 mg SO₂.l⁻¹. Vypočítané dávky sme aplikovali do 6 plastových nádob označených ako VZ1. Následne sme ich označili ako D0 – D5 (dávka 0 – dávka 5), pričom sme pri označovaní postupovali vzostupne.

Rovnaký postup sme použili aj pre zasírenie vzoriek č. 2 a 3.

Označenie vzorky	SO ₂ mg.l ⁻¹	Dávka roztoku supersulfosu
Dávka 0	0	0 ml
Dávka 1	30	0,3 ml
Dávka 2	60	0,6 ml
Dávka 3	90	0,9 ml
Dávka 4	120	1,2 ml
Dávka 5	150	1,5 ml

Obrázok 21 Dávky SO₂ použité na výrobu mikrovzorkov (Zdroj: vlastný)



Obrázok 22 Vzorky mušty pripravené na kvasenie (Zdroj: vlastný)

4.3.1.2 Aktivácia kvasiniek

Na aktiváciu suchých vínnych kvasiniek sme pripravili zmes odloženého muštu a vody v pomere 1:1, obe zložky v dávke 0,6 l. Zmes sme zahriali na približne 35 °C a následne sme do nej pridali ASVK v dávke 8 g, čo zodpovedá 32,5 g.hl⁻¹. Miešaním sme kvasinky v roztoku rozpustili. Po chvíli sa začala tvoriť pena, čo svedčilo o aktivite kvasiniek. Roztok sme rozdelili na 6 rovnakých častí do nachystaných nádob. Aby neprišlo k vyhladovaniu kvasiniek a aby zároveň prišlo k zníženiu teploty a prispôbeniu sa kvasiniek, prilievali sme k zákvasu mušt z nádob VZ1, D0 až D5. Pre každú vzorku sme mali 1 nádobu s aktivovanými kvasinkami. Po vyrovnaní teplôt sme aktivované kvasinky vliali do nádob na kvasenie a starostlivo mušt premiešali. Rovnakým spôsobom prišlo aj k inokulácii ostatných 12 vzoriek, po 6 z dávky 2 a 3.

Alkoholová fermentácia prebiehala pri teplote 14 °C. Samozrejme neprebíhala rovnako, dávky s vyšším obsahom SO₂ sa rozbíhali dlhšie až dlho, ale žiadnu vzorku nebolo treba inokulovať znovu. Po dokvasení bolo víno stočené z kalov do plastových nádob, kde sa zmenou objemu udržiavala čo najnižšia hladina vzduchu a sledovalo sa, či ešte neprebíha záver fermentácie. Následne bolo víno pretočené do sklenených fliaš a uzavreté šraubovým uzáverom.

4.4 Základné chemické analýzy muštu a vína

4.4.1 Stanovenie všetkých titrovateľných kyselín (EEC No 2676/90)

Všetkými titrovateľnými kyselinami (celková kyslosť vína) sa chápe suma všetkých zlúčenín, ktoré sú titrovateľné alkalickým roztokom do pH 7. Kyselina uhličité sa do všetkej kyslosti nezahŕňa.

Prístroje a pomôcky: 25 ml byreta, 10 ml pipeta, 50 ml banka, pH meter, magnetická miešačka.

Roztoky: 0,1 mol.l⁻¹ roztok NaOH

Postup: Pri 20 °C nakalibrujeme podľa návodu pH meter na štandardný tlmivý roztok o hodnote pH 7. Pipetou odmeriame 10 ml pripraveného muštu do titračnej banky. Pridáme 10 ml destilovanej vody a do zmesi ponoríme kombinovanú elektródu pre meranie pH. Za stáleho miešania pomaly pridávame z byrety 0,1 mol.l⁻¹ roztok NaOH do pH rovnajúceho sa hodnote 7 pri 20 °C.

Vyhodnotenie:

$$x = a.f.0,75$$

$x = g.l^{-1}$ všetkých titrovateľných kyselín, vyjadrené na jedno desatinné miesto ako kyselina vínna

$$x' = a.f.10$$

$x' =$ všetky titrovateľné kyseliny vyjadrené na jedno desatinné miesto ako miliekvivalenty v litri

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

$f =$ faktor 0,1 mol.l⁻¹ roztoku NaOH

Opakovateľnosť a reprodukovateľnosť:

$$r = 0,07 \text{ g.l}^{-1} \text{ kyseliny vínnej} \quad r = 0,9 \text{ meq.l}^{-1}$$

$$R = 0,3 \text{ g.l}^{-1} \text{ kyseliny vínnej} \quad R = 3,6 \text{ meq.l}^{-1} \text{ (BALÍK, 2011).}$$



Obrázok 23 Magnetická miešačka s elektródou na meranie pH (Zdroj: vlastný)

4.4.2 Stanovenie redukujúcich cukrov skrátenou metódou podľa Rebeleina

Koncentráciu redukujúcich cukrov stanovíme jodometricky z rozdielnych spotrieb roztoku tiosíranu sodného na titrovanie meďnatého katiónu pri definovanej koncentrácii a jeho zostatku po reakcii s redukujúcimi cukrami vo víne, bez predchádzajúceho odstránenia interferujúcich látok.

Pomôcky: 50 ml byreta, 10, 5 a 2 ml pipeta, 250 ml kužeľovitá banka

Chemikálie a roztoky:

Roztok č. 1: 1000 ml obsahuje 41,92 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ + 10 ml roztoku $0,5 \text{ mol.l}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ v destilovanej vode

Roztok č. 2: 1000 ml obsahuje 250 g vínanu sodno-draselného + 80 g NaOH v destilovanej vode

Roztok č. 3: 1000 ml obsahuje 300 g KJ + 100 ml roztoku $1 \text{ mol.l}^{-1} \text{NaOH}$ v destilovanej vode

Roztok č. 4: 16 % roztok H_2SO_4

Roztok č. 5: 1000 ml obsahuje 10 g škrobu + 10 ml roztoku $1 \text{ mol.l}^{-1} \text{NaOH}$ + 20 g KJ v destilovanej vode

Roztok č. 6: 1000 ml obsahuje 13,7772 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ + 50 ml roztoku $1 \text{ mol.l}^{-1} \text{NaOH}$ v destilovanej vode.

Postup: Do 250 ml banky napipetujeme 10 ml roztoku č. 1 a 5 ml roztoku č. 2. Obsah banky premiešame krúživým pohybom, pridáme niekoľko kúskov pemzy a dopipetujeme 2 ml testovaného vína. Zmes privedieme do varu. Po presne 1,5 minúte zmes ochladíme pridaním 25 ml destilovanej vody a dochladíme na laboratórnu teplotu. Potom pridáme 10 ml roztoku č. 3, 10 ml roztoku č. 4 a 10 ml roztoku č. 5. Hneď titrujeme roztokom č. 6, z modrofialovej do bielej farby, ktorá ostáva po dobu 2 až 3 minút. Kontrolnú – slepú vzorku získame pridaním destilovanej vody namiesto vína.

Vyhodnotenie:

$$x = a - b$$

x = koncentrácia redukujúcich cukrov v testovanom víne v g.l^{-1} vyjadrená na jedno desatinné miesto

a = spotreba roztoku č. 6 pri titrovaní slepej vzorky

b = spotreba roztoku č. 6 pri titrovaní vína (BALÍK, 2011).

4.4.3 Stanovenie oxidu siričitého titrovaním odmerným roztokom jódu

Metóda je založená na oxidovaní voľného oxidu siričitého vo víne odmerným roztokom jódu alebo uvoľnení z väzieb s karbonylovými zlúčeninami v alkalickom prostredí, oxiduje aj viazaný oxid siričitý.

Pomôcky: 250 alebo 500 ml kónická banka, 50 ml pipeta, 10 a 25 ml odmerná banka a 25 ml byreta.

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

Postup pre voľný oxid siričitý: do kónickej banky odmeriame pipetou 50 ml testovaného vína tak, že pipeta sa stále dotýka dna banky. Hneď pridáme 10 ml 16 % roztoku H₂SO₄ a asi 5 ml 0,5 % škrobového mazu a okamžite titrujeme 0,02 mol.l⁻¹ roztokom jódu do modrého zafarbenia, ktoré vydrží 30 sekúnd. Zaznačíme si spotrebu jódu (spotreba a₁).

Postup pre celkový oxid siričitý: do kónickej banky odmeriame 25 ml 1 mol.l⁻¹ roztoku NaOH a odmeriame pipetou 50 ml testovaného vína tak, že pipeta sa stále dotýka dna banky. Necháme stáť 15 minút. Potom pridáme 15 ml 16 % roztoku H₂SO₄ a asi 5 ml 0,5 % škrobového mazu a hneď titrujeme 0,02 mol.l⁻¹ roztokom jódu do modrého zafarbenia, ktoré vydrží 30 sekúnd. Odčítame spotrebu jódu (spotreba a₂).

Vyhodnotenie:

$$x_{1,2} = a_{1,2} \cdot f \cdot 12,8$$

$$x_3 = x_2 - x_1$$

x₁ = mg.l⁻¹ voľného oxidu siričitého vyjadreného v celých číslach

x₂ = mg.l⁻¹ celkového oxidu siričitého vyjadreného v celých číslach

x₃ = mg.l⁻¹ viazaného oxidu siričitého vyjadreného v celých číslach

a_{1,2} = spotreba 0,02 mol.l⁻¹ roztoku jódu na voľný alebo celkový oxid siričitý

f = faktor 0,02 mol.l⁻¹ roztoku jódu (BALÍK, 2011)



Obrázok 24 Titrovacia sústava a roztok na stanovenie SO_2 (Zdroj: vlastný)

4.4.4 Senzorické hodnotenie

Senzorické hodnotenie sa vykonalo na všetkých vínach, celkovo na 18 vzorkách. Hodnotiaca komisia mala 6 členov, ktorí vína bodovali podľa 100 bodovej stupnice a hodnotili ich aj opisne. Snažili sme sa o čo najpresnejšie popísanie charakteru vína a upozorniť na jeho vady, ak sa vyskytli. Degustátori mali v čo najvyššej možnej miere vytvorené podmienky vhodné na hodnotenie. Podľa bodového hodnotenia bol vytvorený aritmetický priemer bodov pre každú vzorku.

Hodnotiteľ: _____ Komisia č.: _____ Vzorke č.: _____
 Kategória: _____ Ročník: _____

DEGUSTAČNÝ HÁROK

		Vynikajúce	Veľmi dobré	Dobré	Odosadačné	Neuspokojivé
Vzhľad	Čiernosť	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 1
	Farba	<input type="checkbox"/> 10	<input type="checkbox"/> 8	<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 2
Vnuk	Čistota	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2
	Intenzita	<input type="checkbox"/> 8	<input type="checkbox"/> 7	<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 2
	Kvalita	<input type="checkbox"/> 16	<input type="checkbox"/> 14	<input type="checkbox"/> 12	<input type="checkbox"/> 10	<input type="checkbox"/> 8
Chuť	Čistota	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 2
	Intenzita	<input type="checkbox"/> 8	<input type="checkbox"/> 7	<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 2
	Perzistencia	<input type="checkbox"/> 8	<input type="checkbox"/> 7	<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 4
	Kvalita	<input type="checkbox"/> 22	<input type="checkbox"/> 19	<input type="checkbox"/> 16	<input type="checkbox"/> 13	<input type="checkbox"/> 10
Celkový dojem		<input type="checkbox"/> 11	<input type="checkbox"/> 10	<input type="checkbox"/> 9	<input type="checkbox"/> 8	<input type="checkbox"/> 7
		(100)	(87)	(74)	(59)	(42)
Ocenenie		<input type="checkbox"/> Veľká zlatá medaľa > 93 b.	<input type="checkbox"/> Zlatá medaľa 88-92,99 b.	<input type="checkbox"/> Strieborná medaľa 86-87,99 b.	<input type="checkbox"/> Bronzová medaľa 75-85,99 b.	
Poznámky:						

Vôňa	0 1 3 5					0 1 3 5				
	radimná	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	sušené ovocie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
minerálna	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	korenistá	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
kvetová	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	orlieková	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
chruštiná	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	kvasicná	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
žlté ovocie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	medová	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
exotické ovocie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	mlá	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Chuť										
kyslá	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	horká	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
sladká	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ferozická	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Celkový dojem										
harmónia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	komplexnosť	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
tráso	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	zákal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nedostatky										
myšina	<input type="checkbox"/>	Eliminácia				hru	<input type="checkbox"/>			
soot	<input type="checkbox"/>	H ₂ S	<input type="checkbox"/>	oxidácia	<input type="checkbox"/>	acetaldéhyd	<input type="checkbox"/>			
masio	<input type="checkbox"/>	proštieň	<input type="checkbox"/>	refermentácia	<input type="checkbox"/>					
h ₂ choroba	<input type="checkbox"/>	korok	<input type="checkbox"/>	lys jadrohá	<input type="checkbox"/>					
Podpis hodnotiteľa					Podpis predsedu komisie					

Obrázok 25 Degustačný hárok použitý pri hodnotení (Zdroj: vlastný)

4.4.5 ALPHA analyzér

Prístroj ALPHA wine analyzer je kompaktný FTIR analyzátor, ktorý využíva vzorkovaciu techniku ATR, čo veľmi zjednodušuje úpravu vzoriek pred samotnou analýzou. Pomocou prístroja môžeme veľmi jednoducho, rýchlo a ekonomicky zistiť základné parametre vína ako sú alkohol, kyseliny, pH, sacharidy a hustota. ALPHA funguje na základe spektrometra. Výsledky analýzy zaznamená na pripojený počítač vo forme grafu a v tabuľke.

Postup: pred začatím práce musí byť prístroj nakalibrovaný. Najprv ho starostlivo prepláchneme deionizovanou vodou. Následne prebehne analýza tejto vzorky - deionizovanej vody, čím overíme nakalibrovanie prístroja. V prípade nezhôd musí najprv prísť k správne nastaveniu. Až potom môžeme prejsť k samotnej analýze vzoriek. Číru vzorku naberieme pomocou striekačky a prístroj ňou prepláchneme. Druhá dávka tej istej vzorky nám už slúži na analýzu. Zozbierané dáta automaticky vyhodnocuje softvér. Keďže prístroj vykazuje menšie odchýlky, každá vzorka bola zmeraná 3-krát a do tabuľky boli zaznamenané hodnoty.

4.4.6 HPLC analýza karbonylových zlúčenín vo víne

Metóda HPLC (High-performance liquid chromatography – vysoko účinná kvapalinová chromatografia) je fyzikálno chemická metóda, ktorá slúži na separáciu zložiek vzorky, na ich identifikáciu a tiež kvantifikáciu. Jej podstatou je rozdeľovanie zložiek zmesi medzi dvoma fázami, nepohyblivou (stacionárnou) a pohyblivou (mobilnou). Pohyblivá fáza vstupuje za pomoci vysoko tlakového čerpadla do kolóny menších rozmerov. V nej sa nachádza sorbent, tvorený veľmi malými časticami (2-50 mikrometrov), najčastejšie zo silikátu alebo polymérov. Na tieto častice sa viaže stacionárna fáza.

Princíp separácie spočíva v rozdielnej schopnosti zadržovania látok v chromatografickej kolóne na sorbente. Interakcie medzi sorbentom a zložkami vzorky sú fyzikálnej povahy, napríklad hydrofóbnej, alebo na základe polarita.

HPLC sa od ostatných chromatografických metód odlišuje vyšším tlakom (50 až 350 barov), zatiaľ čo pri bežných kvapalinových chromatografiách mobilná fáza prepadá cez kolónu len vďaka gravitácii. Kvôli malému množstvu vzorky oddelenej v HPLC má tiež vyššiu rozlišovaciu schopnosť (MOLIKI a kol, 2014).



Obrázok 26 HPLC (Zdroj: vlastný)

Použijeme metódu HPLC pre určovanie karbonylových zlúčenín – acetaldehydu, glyceraldehydu, kyseliny pyrohroznovej, kyseliny 2-oxoglutárovej a formaldehydu vo víne pomocou kvapalnej chromatografie s detekciou diódovým poľom. Tieto zlúčeniny sú aj vo voľnej forme, ale aj viazané s SO_2 , preto použijeme techniku založenú na rozklade týchto väzieb hydrolyzou v alkalickej prostredí pomocou pridania 2,4-dinitrofenylhydrazónu. Pri pokuse je dôležité zamedzenie vplyvu kyslíka, ktorý zvyšuje koncentráciu karbonylových zlúčenín. Táto technika ponúka dobrú špecifickosť, opakovateľnosť (% RSD 0,45-10,6) a detekovateľnosť ($1,29\text{-}7,53 \mu\text{g.l}^{-1}$) (ELIAS a kol., 2008). Túto metódu nedávno zjednodušil HAN a kol. (2015), pričom na rozklad väzieb je použitá kyselina namiesto bázy a reakcie sú urýchlené teplom.

Postup: do 100 μl testovaného vína pridáme 100 μl 1 mol.l^{-1} NaOH a nechá sa 10 minút stáť pri izbovej teplote. Potom pridáme 100 μl 1,2 mol.l^{-1} H_2SO_4 a 200 mikrol 12 mmol.l^{-1} 2,4-dinitrofenylhydrazónu v acetonitrile. Nechá sa 10 minút odstáť pri teplote 60 °C a potom 20 μl roztoku aplikujeme do HPLC na testovanie.

Prístroj: Binárny vysokotlakový systém Shitadzu LC-10A

Kontrolný systém: SCL-10Avp

Pumpa: 2 x LC-10ADvp

Kolónový termostat s manuálnym vstrekovacím ventilom Rheodyne: CTO-10ACvp

DAD detektor: SPD-M10Avp

Software: Lcsolution

Podmienky separácie:

Kolóna: Macherey-Nagel Nucleoshell RP18 2,7 μm ; 3 x 100 mm sústava + predkolóna 3 x 7,5 mm

Teplota: 60 $^{\circ}\text{C}$

Objem vstrekovanej vzorky: 20 μl

Prietok mobilnej fázy: 0,6 ml.min⁻¹

Mobilná fáza A: 15 mM HClO₄

Mobilná fáza B: 15 mM 90 % ACN

0,00 min	20 % B
1,00 min	40 % B
5,00 min	60 % B
5,50 min	100 % B
6,00 min	100 % B
6,01 min	0 % B
6,49 min	0 % B
6,50 min	20 % B

Obrázok 27 Gradientový program (Zdroj: vlastný)

Chromatogram bol snímaný pri 365 nm. Dáta boli zaznamenávané v rozpätí 200 - 520 nm.

Vyhodnocovanie jednej vzorky trvalo 9 minút.

5 Výsledky

5.1 Stanovenie všetkých titrovateľných kyselín

Pri analýze vzorky muštu sme získali hodnotu $9,8 \text{ g.l}^{-1}$ všetkých titrovateľných kyselín. Nebol prevedený rozbor na stanovenie jednotlivých kyselín, pre účely tejto práce to nebolo potrebné. Množstvo titrovateľných kyselín je vyššie, ale v medziach uvádzaných pre danú odrodu. Odzrkadľuje priebeh ročníka, keď studený a daždivý záver leta prispel k nižšiemu odbúravaniam kyseliny jablčnej.

5.2 Stanovenie redukujúcich cukrov

Vzorka	Dávka SO_2 v mg.l^{-1}	Spotreba roztoku v ml	Koncentrácia red. cukrov v g.l^{-1}
1	0	30,0	0,0
1	30	29,8	0,2
1	60	29,8	0,2
1	90	29,4	0,6
1	120	29,9	0,1
1	150	24,4	5,6
2	0	30,0	0,0
2	30	29,6	0,4
2	60	29,7	0,3
2	90	29,4	0,6
2	120	29,8	0,2
2	150	28,9	1,1
3	0	29,9	0,1
3	30	28,8	1,2
3	60	29,0	1,0
3	90	29,0	1,0
3	120	29,1	0,9
3	150	28,4	1,6
slepý pokus	0	30,0	0,0

Obrázok 28 Tabuľka s obsahom redukujúcich cukrov v mikrovzorkách vína (Zdroj: vlastný)

Redukujúce cukry, sú všetky cukry ktoré neboli kvasinkami prekvasené na alkohol. Z tabuľky vidíme, že okrem vzorky 1 s dávkou $150 \text{ mg SO}_2.\text{l}^{-1}$, všetky ostatné vína z hľadiska hodnoty redukujúcich cukrov spadajú do kategórie suché vína. Spomínaná vzorka sa radí do kategórie polosuchých vín. Najnižšie hodnoty cukru (0 g) boli u vzoriek 1 a 2, ktoré neboli vôbec zasírené. Najvyššia hodnota je pri uvedenej maximálnej dávky SO_2 vo vzorke 1 ($5,6 \text{ g.l}^{-1}$). Tieto údaje potvrdzuje aj tabuľka uvedená nižšie ktorá nám hovorí, že v priemere najnižšie hodnoty redukujúcich cukrov sú pri nezasírených vzorkách. Životné prostredie kvasiniek nebolo oxidom siričitým vôbec ovplyvnené a takmer všetok cukor premenili na alkohol. Naopak, kvasinky mali najťažšie podmienky na fermentáciu pri $150 \text{ mg SO}_2.\text{l}^{-1}$ a to sa prejavilo aj v najvyššej priemernej hodnote redukujúcich cukrov v týchto vzorkách.

Dávka SO ₂ v mg.l ⁻¹	Priemerná koncentrácia red. cukrov v g.l ⁻¹
0	0,03
30	0,60
60	0,50
90	0,73
120	0,40
150	2,77

Obrázok 29 Priemerné hodnoty redukujúcich cukrov v závislosti na dávke SO₂
(Zdroj: vlastný)

5.3 Stanovenie voľného a celkového oxidu siričitého

Meranie prebehlo v laboratóriu Mendelovej univerzity na fakulte v Lednici. Hodnoty voľného a celkového SO₂ pre príslušnú vzorku boli po nameraní zaznamenané do tabuliek.

VZORKA 1		
Dávka SO ₂ v mg	Voľný SO ₂ v mg	Celkový SO ₂ v mg
0	0,12	2,67
30	0,00	2,67
60	2,67	21,86
90	3,95	33,37
120	5,23	65,35
150	7,79	116,51

Obrázok 30 Hodnoty SO₂ vo vzorke 1 (Zdroj: vlastný)

VZORKA 2		
Dávka SO ₂ v mg	Voľný SO ₂ v mg	Celkový SO ₂ v mg
0	0,12	3,95
30	1,40	4,59
60	3,31	19,94
90	3,31	37,41
120	3,95	92,20
150	6,51	111,39

Obrázok 31 Hodnoty SO₂ vo vzorke 2 (Zdroj: vlastný)

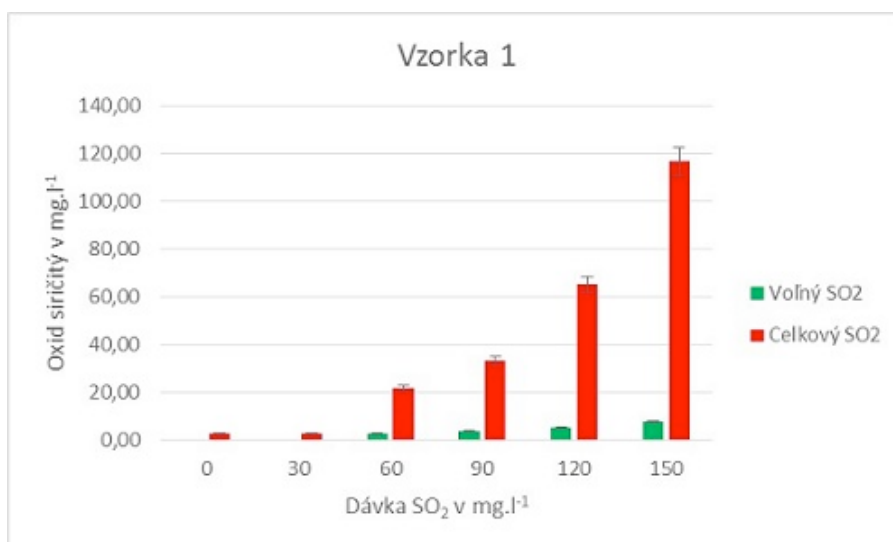
VZORKA 3		
Dávka SO ₂ v mg	Voľný SO ₂ v mg	Celkový SO ₂ v mg
0	0,76	3,95
30	2,67	5,23
60	3,31	25,70
90	4,59	41,68
120	3,31	73,66
150	7,15	117,78

Obrázok 32 Hodnoty SO₂ vo vzorke 3 (Zdroj: vlastný)

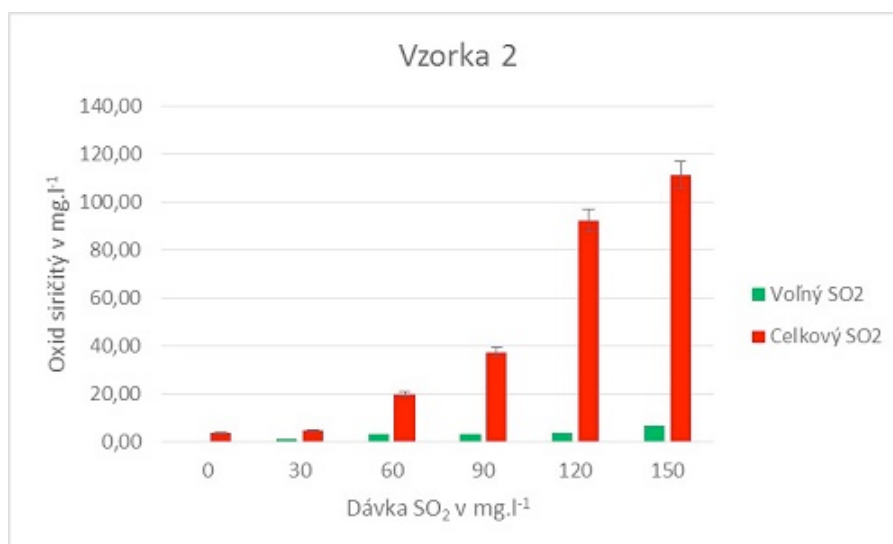
Z tabuliek je vidieť, že dávky voľného oxidu siričitého sú veľmi nízke. Je to preto, že víno po ukončení alkoholovej fermentácie nebolo zasírené a všetok oxid siričitý pridaný do muštu pred fermentáciou, by mal prejsť do viazanej formy. Nakoľko väzby oxidu siričitého s inými látkami, ktoré sa s ním neviažu tak pevne ako acetaldehyd sa môžu rozpadáť keď príde k vyčerpaniu hladiny voľného oxidu siričitého oxidáciou, je SO₂ z týchto väzieb uvoľnený (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a). Preto sa určitá hladina voľného SO₂ objavuje pri takmer všetkých vzorkách. Je najvyššia pri dávkach oxidu siričitého 150 mg.l⁻¹. Pri nich je najväčšia kapacita SO₂ a väzieb, z ktorých sa môže uvoľniť. Taktiež treba kalkulovať s určitou chybovosťou pri stanovovaní SO₂ aj reduktónov. Pri hladinách SO₂ rádovo v mg na liter, môžu tieto chyby pri meraní významne ovplyvniť výsledné hodnoty.

Hodnoty celkového SO₂ môžeme pozorovať aj vo vzorkách v ktorých pridaný nebol. Jedná sa o SO₂ vyprodukovaný kvasinkami. Kvasinky sú bežne schopné produkovať SO₂ zpracovaním síry, ktorá je hroznu dodaná vo vinohrade. Tvoria SO₂ v hodnotách rádovo 10-20 mg.l⁻¹. Výrazne vyššie dávky produkujú iba kvasinky so sírnym metabolizmom. Nami použitý kmeň kvasiniek tvorí nižšie hodnoty SO₂.

V hodnotách pridaného SO₂ a celkového SO₂ vo víne, je vidieť nesúladi vo forme strát. Tento SO₂ bol spotrebovaný kvasinkami na syntézu sírných látok a aminokyselín (Farkaš, 1983).



Obrázok 33 Graf hodnôt SO₂ vo víne vzorky 1 (Zdroj: vlastný)



Obrázok 34 Graf hodnôt SO₂ vo víne vzorky 2 (Zdroj: vlastný)



Obrázok 35 Graf hodnôt SO₂ vo víne vzorky 3 (Zdroj: vlastný)

Z uvedených grafov je možné vidieť zvyšujúcu sa hladinu celkového SO₂ v závislosti na dávke SO₂ pridanej do muštu. Korelačnú závislosť týchto znakov sme spracovali v programe “Statistica“.

Korelace (Tabulka14)				
Označ. korelace jsou významné na hlad. p < ,01000				
N=6 (Celé případy vynechány u ChD)				
Proměnná	Průměry	Sm.odch.	Dávka SO2 v mg	Celkový SO2 v mg
Dávka SO2 v mg	75,00000	56,12486	1,000000	0,935080
Celkový SO2 v mg	40,40500	43,94427	0,935080	1,000000

Obrázok 36 Korelácia dávky SO₂ a celkového SO₂ vo vzorke 1 (Zdroj: vlastný)

Korelace (Tabulka11)				
Označ. korelace jsou významné na hlad. p < ,01000				
N=6 (Celé případy vynechány u ChD)				
Proměnná	Průměry	Sm.odch.	Dávka SO2 v mg	Celkový SO2 v mg
Dávka SO2 v mg	75,00000	56,12486	1,000000	0,947297
Celkový SO2 v mg	44,91333	46,12832	0,947297	1,000000

Obrázok 37 Korelácia dávky SO₂ a celkového SO₂ vo vzorke 2 (Zdroj: vlastný)

Korelace (Tabulka6)				
Označ. korelace jsou významné na hlad. p < ,01000				
N=6 (Celé případy vynechány u ChD)				
Proměnná	Průměry	Sm.odch.	Dávka SO2 v mg	Celkový SO2 v mg
Dávka SO2 v mg	75,00000	56,12486	1,000000	0,955890
Celkový SO2 v mg	44,66667	44,19938	0,955890	1,000000

Obrázok 38 Korelácia dávky SO₂ a celkového SO₂ vo vzorke 3 (Zdroj: vlastný)

Pri testovaní sme zistili, že celkový oxid siričitý je vysoko závislý na dávke oxidu siričitého, ktorý je do muštu pridaný pred kvasením. Dokazujú to hodnoty “r“, ktoré sú veľmi blízke 1: r = 0,935080 pre VZ1; 0,947297 pre VZ2; 0,955890 pre VZ3. Testovanie potvrdilo vysokú signifikantnosť na hladine $\alpha < 0,01$.

5.4 Senzorická analýza vína

Po senzorickej analýze boli údaje z degustačných lístkov spracované do nasledujúcej tabuľky:

Vzorka	Dávka SO ₂ (mg.l ⁻¹)	Bodové hodnotenie
1	0	63,7
1	30	70,8
1	60	73,0
1	90	70,0
1	120	73,5
1	150	79,7
2	0	64,5
2	30	71,5
2	60	72,7
2	90	78,5
2	120	79,2
2	150	81,8
3	0	62,0
3	30	71,3
3	60	74,8
3	90	73,2
3	120	76,2
3	150	80,7

Obrázok 39 Tabuľka senzorickeho hodnotenie vzoriek vína (Zdroj: vlastný)

Bodový priemer za jednotlivé vzorky bol: VZ1: 71,78 bodu, VZ2: 74,69 bodu a VZ3: 73,03 bodu. Rozdiely medzi týmito hodnotami nie sú štatisticky významné.

Vína boli hodnotené ako kyslé, bez výrazného tela, s jemnou, pri vyšších dávkach SO₂ strednou aromatickou, založenou na esteroch. Všetky 3 vzorky, kde nebol pridaný žiadny oxid siričitý vykazovali silné prejavy myšiny. V menšej miere na túto vadu hodnotitelia poukazovali aj u vzoriek VZ1 a VZ3 – dávka SO₂ 30 mg.l⁻¹. Všetky vína s dávkami SO₂ 0 a 30 mg.l⁻¹ boli silne zoxidované, ale mierna oxidácia sa prejavovala aj vo vínach s dávkou SO₂ 60 mg.l⁻¹. Najlepšie hodnotené vína boli u všetkých vzoriek s dávkami SO₂ 120 a 150 mg.l⁻¹, čomu zodpovedá aj ich bodové hodnotenie.

5.5 Analýza vína na prístroji ALPHA

Z dôvodu odchýlky merania prístroja, sú všetky vzorky merané 3-krát. V tabuľke na základe získaných údajov uvádzame priemerné hodnoty.

Vzorka	Alkohol %	Tit. kys. g.l ⁻¹	Red.cukry g.l ⁻¹	pH g.l ⁻¹	K. jablčná g.l ⁻¹	K. mliečna g.l ⁻¹	K. octová g.l ⁻¹	K. vínna g.l ⁻¹	Glukóza g.l ⁻¹	Fruktóza g.l ⁻¹
VZ1-D0	12,75	6,83	0,1	3,59	3,85	0,11	0,43	2,19	0,00	0,44
VZ1-D1	12,58	6,92	0,2	3,46	3,86	0,07	0,47	2,13	0,00	1,04
VZ1-D2	12,72	6,69	0,2	3,53	3,80	0,04	0,46	2,17	0,02	1,17
VZ1-D3	12,64	6,83	0,6	3,50	4,05	0,00	0,41	2,29	0,04	1,43
VZ1-D4	12,71	6,63	0,1	3,51	4,14	0,00	0,64	2,05	0,00	0,43
VZ1-D5	12,34	7,19	5,4	3,47	5,15	0,00	0,67	2,10	0,00	6,71
VZ2-D0	12,80	6,07	0,0	3,56	3,59	0,01	0,55	2,03	0,00	1,15
VZ2-D1	12,74	6,57	0,4	3,50	3,76	0,01	0,49	2,23	0,13	1,51
VZ2-D2	12,68	6,33	0,4	3,48	3,57	0,00	0,49	2,15	0,12	1,13
VZ2-D3	12,65	6,33	0,5	3,49	3,65	0,02	0,48	2,03	0,00	1,72
VZ2-D4	12,72	6,13	0,2	3,51	3,84	0,00	0,45	2,18	0,00	1,42
VZ2-D5	12,78	6,57	1,0	3,51	4,47	0,00	0,69	1,83	0,00	1,79
VZ3-D0	12,68	6,38	0,3	3,48	3,30	0,01	0,55	2,16	0,04	1,27
VZ3-D1	12,60	6,51	1,4	3,44	3,61	0,00	0,53	2,08	0,00	2,09
VZ3-D2	12,58	6,58	1,4	3,43	3,79	0,00	0,51	2,11	0,03	1,95
VZ3-D3	12,55	6,56	0,9	3,40	3,82	0,00	0,49	2,20	0,09	2,03
VZ3-D4	12,61	6,48	0,8	3,37	4,03	0,00	0,54	2,06	0,03	1,93
VZ3-D5	12,54	6,90	1,3	3,37	4,24	0,00	0,71	2,15	0,00	2,91

Obrázok 40 Tabuľka sensorického hodnotenie vzoriek vína (Zdroj: vlastný)

Priemerné hodnoty alkoholu pre jednotlivé vzorky sú 12,62 % pri VZ1, 12,73 % pri VZ2 a 12,59 % pri VZ3. Namerané hodnoty sa medzi sebou štatisticky významne nelíšia. Hodnota alkoholu je vyššia ako predpokladaná hodnota (20,5 °NM zodpovedá 12,2 % alk. (Steidl, 2010)). Vysvetlením môže byť schopnosť použitých kvasiniek odbúravať kyselinu jablčnú na alkohol a oxid uhličitý.

Priemerné hodnoty celkových titrovateľných kyselín pre vzorky sú: 6,85 mg.l⁻¹ pre VZ1, 6,33 mg.l⁻¹ pre VZ2 a 6,57 mg.l⁻¹ pre VZ3. Štatisticky sa vzorky líšia na hladine $\alpha < 0,05$. Líši sa VZ1 od VZ2 a VZ3. Na hladine $\alpha < 0,01$ sa žiadna zo vzoriek neodlišuje od inej.

Dvojice proměnných	Znaménkový test (Tabulka13) Označené testy jsou významné na hladině p <,05000			
	Počet různých	procent v < V	Z	p-hodn.
Tit. Kys. 1 & Tit. Kys. 1				
Tit. Kys. 1 & Tit. Kys. 2	6	0,0000	2,041241	0,041227
Tit. Kys. 1 & Tit. Kys. 3	6	0,0000	2,041241	0,041227
Tit. Kys. 2 & Tit. Kys. 1	6	100,0000	2,041241	0,041227
Tit. Kys. 2 & Tit. Kys. 2				
Tit. Kys. 2 & Tit. Kys. 3	6	83,3333	1,224745	0,220671
Tit. Kys. 3 & Tit. Kys. 1	6	100,0000	2,041241	0,041227
Tit. Kys. 3 & Tit. Kys. 2	6	16,6667	1,224745	0,220671
Tit. Kys. 3 & Tit. Kys. 3				

Obrázok 41 Porovnanie významu rozdielu hodnôt (Zdroj: vlastný)

Hodnoty celkových titrovateľných kyselín sú výrazne nižšie od hodnôt stanovených

v mušte. Za pokles kyseliny jablčnej zodpovedá metabolizmus použitých kvasiniek. Sú schopné odbúrať až 30 % kyseliny jablčnej. Hodnotu ovplyvňuje aj kyselina vínna. Za jej pokles v priebehu vyzrievania vína môže jej vypadávanie vo forme vínneho kameňa. Je to prirodzený proces, ktorým sa víno samovoľne odkyseluje (Steidl, 2010).

Vo víne sú badateľné stopy kyseliny mliečnej. Mohlo by sa jednať o začiatok malolaktickej fermentácie, nakoľko sa vyskytujú pri vzorkách ktoré neboli zasírené, alebo boli zasírené nižšou dávkou SO₂. Nakoľko pri sensorickej analýze vína ktorá v časovom horizonte prebehla až po analýze vzoriek na prístroji ALPHA, neboli badať charakteristické znaky tohto procesu, vysvetľujeme si tieto hodnoty ako chybu merania prístroja.

Štatisticky sú priemerné namerané hodnoty kyseliny jablčnej: VZ1 - 4,14 mg.l⁻¹, VZ2 - 3,81 mg.l⁻¹, VZ3 - 3,8 mg.l⁻¹. Vzorka 1 sa odlišuje od oboch ostatných vzoriek na hladine $\alpha < 0,05$. Množstvá kyseliny vínnej na základe porovnania jednotlivých vzoriek sa štatisticky významne neodlišujú. Priemerné hodnoty pre kyselinu vínnu sú: VZ1 - 2,16 mg.l⁻¹, VZ2 - 2,08 mg.l⁻¹ a VZ3 - 2,13 mg.l⁻¹.

Kyselina octová sa v žiadnej vzorke nenachádza v množstve, ktorá by mohlo víno sensoricky negatívne ovplyvniť. Čo sa týka priemerných hodnôt vzoriek sú pri VZ1 - 0,51 mg.l⁻¹, pri VZ2 - 0,53 mg.l⁻¹ a pri VZ3 - 0,56 mg.l⁻¹. Štatisticky sa odlišuje hodnota vzoriek č. 3 od vzoriek č. 1 a č. 2, na hladine $\alpha < 0,05$. Na hladine $\alpha < 0,01$ sa vzorky už neodlišujú.

Redukujúce cukry sa miestami odlišujú od hodnôt získaných ručným meraním. Ide o súčet odchýlok merania pri stanovení a pri analýze prístrojom ALPHA. Redukujúcim cukrom je fruktóza. Je to z dôvodu, že kvasinky sú glukofilné, pri fermentácii uprednostňujú glukózu pred fruktózou.

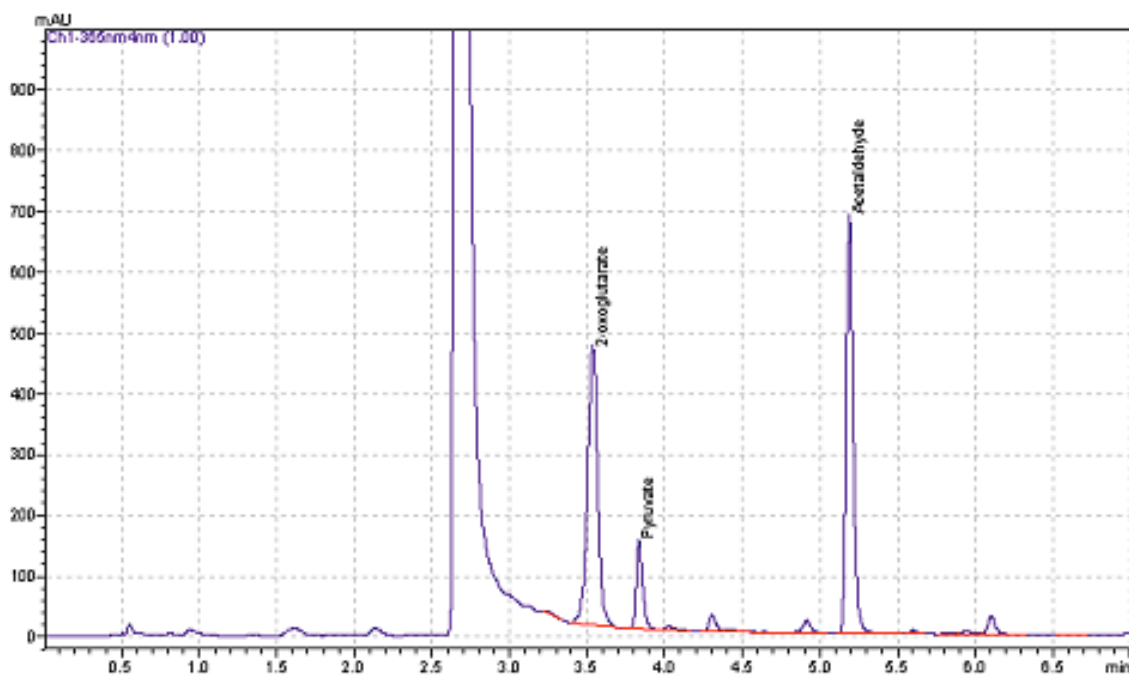
Hodnoty pH sú pri všetkých vzorkách mierne vyššie. Ich priemerné hodnoty sú pri VZ1 - 3,51 mg.l⁻¹, VZ2 - 3,51 mg.l⁻¹ a pri VZ3 - 3,43 mg.l⁻¹. Štatisticky sa od seba vzorky 1, 2 a 3 významne nelíšia.

Analýza na prístroji ALPHA nám umožnila získať o testovaných vínach komplexné hodnoty menej pracnou metódou oproti ručnému meraniu. Ich spracovaním môžeme konštatovať, že vína so vzorkou výživy č. 1 (bez pridanej výživy) sa líšia od vín vzoriek č. 2 a č. 3 vyšším obsahom kyseliny jablčnej, čo sa prejavuje vo vyššom obsah všetkých titrovateľných kyselín. Vzorka č. 3 sa od oboch vzoriek líši vyšším obsahom kyseliny octovej. Všetky tieto spomenuté rozdiely sa ukazujú ako významné na hladine významnosti $\alpha < 0,05$.

5.6 HPLC analýza karbonylových zlúčenín vo víne

Analýzu vína na stanovenie karbonylových zlúčenín kyseliny pyrohroznovej, kyseliny 2-oxoglutarovej a acetaldehydu sme vykonali v laboratóriu na fakulte v Lednici. Z výsledných chromatogramov sme vyčítali koncentrácie týchto zlúčenín.

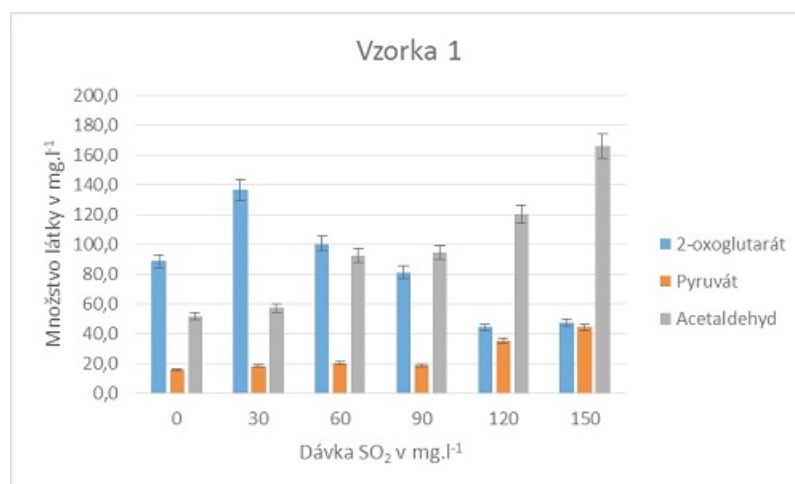
Číselné údaje sme zaznamenali do tabuľky. Pre lepšiu prehľadnosť výsledky uvádzame aj v grafoch.



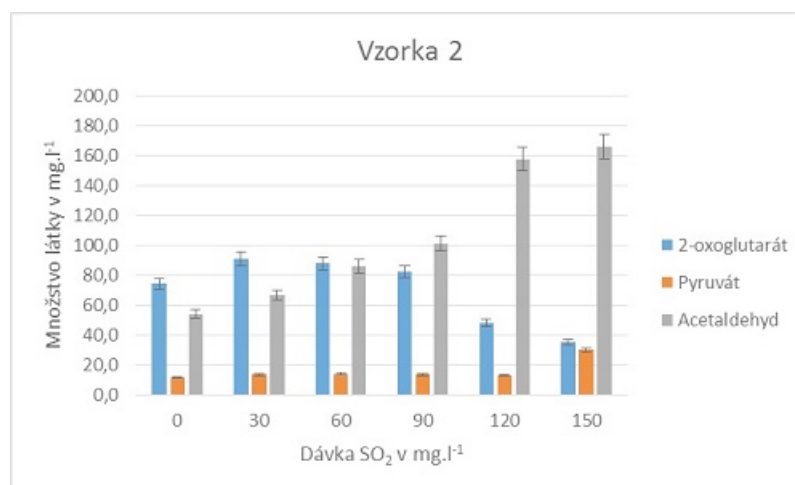
Obrázok 42 Chromatogram z HPLC analýzy (Zdroj: vlastný)

Vzorka	k. 2-oxoglutarová mg.l ⁻¹	k. pyrohroznovej mg.l ⁻¹	Acetaldehyde mg.l ⁻¹
VZ1-D0	88,5	15,9	51,9
VZ1-D1	136,4	18,5	57,2
VZ1-D2	100,5	20,3	92,6
VZ1-D3	81,3	19,0	94,5
VZ1-D4	44,5	35,5	120,4
VZ1-D5	47,4	44,5	165,9
VZ2-D0	74,3	11,8	54,1
VZ2-D1	91,2	13,9	66,9
VZ2-D2	88,0	14,2	86,0
VZ2-D3	82,6	13,9	101,4
VZ2-D4	48,2	13,3	157,4
VZ2-D5	35,3	30,1	166,1
VZ3-D0	47,9	10,6	71,5
VZ3-D1	64,1	17,6	61,1
VZ3-D2	64,8	16,0	75,2
VZ3-D3	70,3	18,7	100,3
VZ3-D4	58,3	31,6	148,6
VZ3-D5	34,0	33,8	157,8

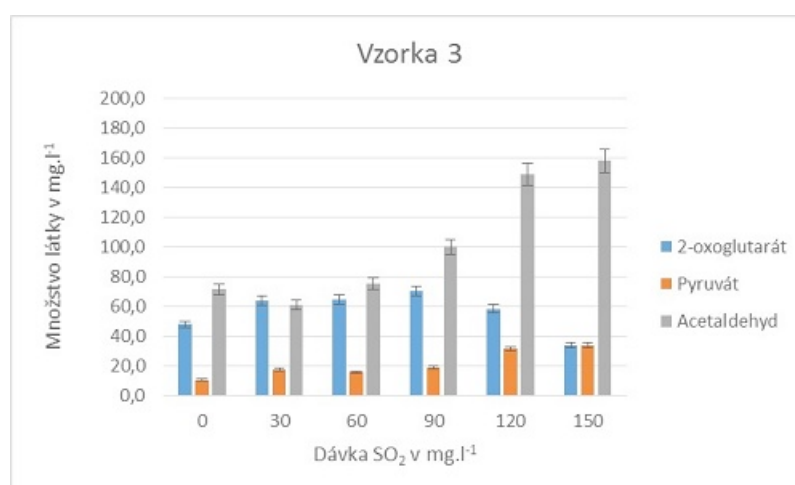
Obrázok 43 Hodnoty karbonylových zlúčenín



Obrázok 44 Graf karbonylových zlúčenín vo vzorke 1 (Zdroj: vlastný)



Obrázok 45 Graf karbonylových zlúčenín vo vzorke 2 (Zdroj: vlastný)



Obrázok 46 Graf karbonylových zlúčenín vo vzorke 3 (Zdroj: vlastný)

Z grafov je vidieť jasnú lineárnu závislosť medzi dávkou SO₂ a acetaldehydom a naznačujú aj závislosť medzi dávkou SO₂ a kys. pyrohroznovou. Je potrebné zistiť či sú

nejaké korelačné vzťahy medzi vytvorenými látkami a dávkou SO₂, alebo či existujú vzťahy medzi vytvorenými zlúčeninami, ktorými sa ovplyvňujú.

Korelace (VZ1)						
Označ. korelace jsou významné na hlad. p < ,05000						
N=6 (Celé případy vynechány u ChD)						
Proměnná	Průměry	Sm.odch.	Dávka SO ₂ v mg	2-oxoglutarate v mg	Pyruvate v mg	Acetaldehyde v mg
Dávka SO ₂ v mg	75,00000	56,12486	1,000000	-0,775991	0,888899	0,962701
2-oxoglutarate v mg	83,10000	34,46883	-0,775991	1,000000	-0,785163	-0,795940
Pyruvate v mg	25,61667	11,58765	0,888899	-0,785163	1,000000	0,936338
Acetaldehyde v mg	97,08333	42,28094	0,962701	-0,795940	0,936338	1,000000

Obrázok 47 Korelačná matica vzorky 1 (Zdroj: vlastný)

Z korelačnej matice vzorky 1 nám vyplýva, že existuje silná štatisticky významná korelačná závislosť medzi dávkou SO₂ a kys. pyrohroznovou, medzi dávkou SO₂ a acetaldehydom a medzi kys. pyrohroznovou a acetaldehydom. Je možnosť, že korelačná závislosť medzi kys. pyrohroznovou a acetaldehydom je ovplyvnená dávkou SO₂, ktorá tieto hodnoty spája.

Parciální korelace (VZ1)					
S vyloučením vlivu: Dávka SO ₂ v mg					
Označ. korelace jsou významné na hlad. p < ,05000					
N=6 (Celé případy vynechány u ChD)					
Proměnná	Průměry	Sm.odch.	2-oxoglutarate v mg	Pyruvate v mg	Acetaldehyde v mg
2-oxoglutarate v mg	83,10000	34,46883	1,000000	-0,330114	-0,286491
Pyruvate v mg	25,61667	11,58765	-0,330114	1,000000	0,650225
Acetaldehyde v mg	97,08333	42,28094	-0,286491	0,650225	1,000000

Obrázok 48 Parciálna korelácia vzorky 1 (Zdroj: vlastný)

Čiastočná korelácia s vylúčením dávky SO₂ nám preukázateľne vylúčila závislosť medzi acetaldehydom a kys. pyrohroznovou. Tieto dve látky sa štatisticky významne neovplyvňujú. Vo vzorke 1 sú z hľadiska tvorby karbonylových zlúčenín významné korelácie medzi dávkou SO₂ a kys. pyrohroznovou na hladine významnosti $\alpha < 0,05$, $r = 0,888899$. Jedná sa o silnú, pozitívnu závislosť. Medzi dávkou SO₂ a acetaldehydom je významna korelácia na hladine $\alpha < 0,01$. Táto závislosť je veľmi signifikantná, $r = 0,962701$. Je takisto pozitívna a veľmi silná.

Korelace (VZ2)						
Označ. korelace jsou významné na hlad. p < ,05000						
N=6 (Celé případy vynechány u ChD)						
Proměnná	Průměry	Sm.odch.	Dávka SO ₂ v mg	2-oxoglutarate v mg	Pyruvate v mg	Acetaldehyde v mg
Dávka SO ₂ v mg	75,00000	56,12486	1,000000	-0,767710	0,696206	0,969783
2-oxoglutarate v mg	69,93333	22,93466	-0,767710	1,000000	-0,701019	-0,873610
Pyruvate v mg	16,20000	6,86382	0,696206	-0,701019	1,000000	0,658681
Acetaldehyde v mg	105,3167	46,67922	0,969783	-0,873610	0,658681	1,000000

Obrázok 49 Korelačná matica vzorky 2 (Zdroj: vlastný)

Z tejto korelačnej matice nám vyplýva korelačná závislosť medzi acetaldehydom a dávkou SO₂ ale tiež veľmi silná negatívna závislosť medzi acetaldehydom a kyselinou 2-oxoglutarovou. Vzťah medzi acetaldehydom a kyselinou 2-oxoglutarovou objasníme pomocou čiastočnej korelácie s vylúčením dávky SO₂.

Parciální korelace (VZ2)					
S vyloučením vlivu: Dávka SO ₂ v mg					
Označ. korelace jsou významné na hlad. p < ,05000					
N=6 (Celé případy vynechány u ChD)					
Proměnná	Průměry	Sm.odch.	2-oxoglutarate v mg	Pyruvate v mg	Acetaldehyde v mg
2-oxoglutarate v mg	69,9333	22,93466	1,000000	-0,362039	-0,825778
Pyruvate v mg	16,2000	6,86382	-0,362039	1,000000	-0,094142
Acetaldehyde v mg	105,3167	46,67922	-0,825778	-0,094142	1,000000

Obrázok 50 Parciálna korelácia vzorky 2 (Zdroj: vlastný)

Vzťah medzi acetaldehydom a kyselinou 2-oxoglutárovou štatisticky významný nie je. Pri vzorke 2 existuje štatisticky významná závislosť iba medzi dávkou SO₂ a acetaldehydom. Je veľmi signifikantná na hladine $\alpha < 0,01$, $r = 0,969783$.

Korelace (VZ3)						
Označ. korelace jsou významné na hlad. p < ,05000						
N=6 (Celé případy vynechány u ChD)						
Proměnná	Průměry	Sm.odch.	Dávka SO ₂ v mg	2-oxoglutarate v mg	Pyruvate v mg	Acetaldehyde v mg
Dávka SO ₂ v mg	75,0000	56,12486	1,000000	-0,324213	0,931332	0,926361
2-oxoglutarate v mg	56,5667	13,42023	-0,324213	1,000000	-0,450350	-0,526619
Pyruvate v mg	21,3833	9,22311	0,931332	-0,450350	1,000000	0,941436
Acetaldehyde v mg	102,4167	41,49301	0,926361	-0,526619	0,941436	1,000000

Obrázok 51 Korelačná matica vzorky 3 (Zdroj: vlastný)

Korelačná matica vzorky 3 nám hovorí o štatisticky významnej koreláci medzi dávkou SO₂ a kys. pyrohroznovou, medzi dávkou SO₂ a acetaldehydom a medzi acetaldehydom a kys. pyrohroznovou. Opäť je potrebné sa pozrieť na vzťah medzi acetaldehydom a kys. pyrohroznovou pomocou čiastočnej korelácie s vylúčením vplyvu SO₂.

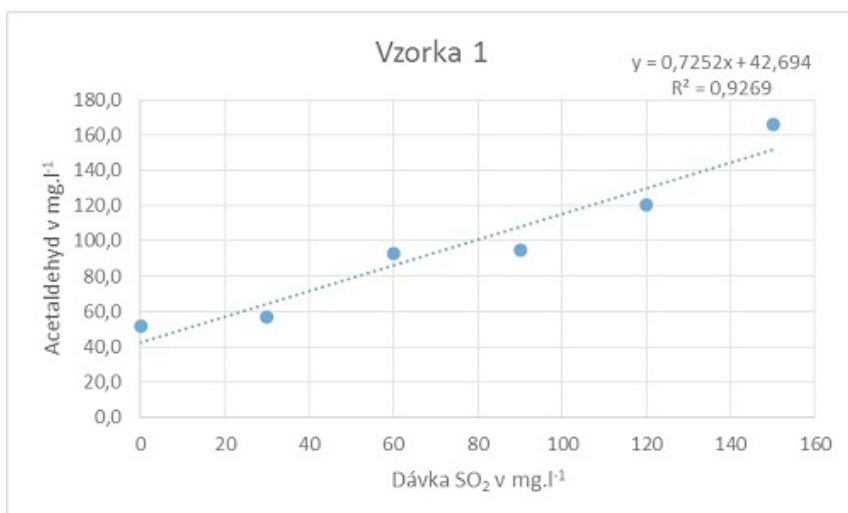
Parciální korelace (VZ3)					
S vyloučením vlivu: Dávka SO ₂ v mg					
Označ. korelace jsou významné na hlad. p < ,05000					
N=6 (Celé případy vynechány u ChD)					
Proměnná	Průměry	Sm.odch.	2-oxoglutarate v mg	Pyruvate v mg	Acetaldehyde v mg
2-oxoglutarate v mg	56,5667	13,42023	1,000000	-0,430771	-0,635098
Pyruvate v mg	21,3833	9,22311	-0,430771	1,000000	0,573682
Acetaldehyde v mg	102,4167	41,49301	-0,635098	0,573682	1,000000

Obrázok 52 Parciálna korelácia vzorky 3 (Zdroj: vlastný)

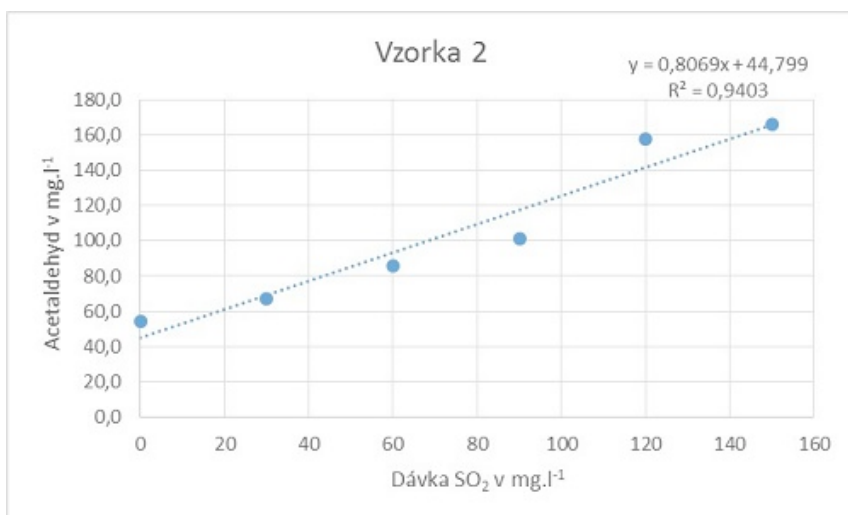
Čiastočná korelácia preverila vzťah medzi acetaldehydom a kys. pyrohroznovou. Bez vplyvu dávky SO₂ nemá štatistickú významnosť. Vo vzorke 3 je štatisticky významná korelácia medzi dávkou SO₂ a acetaldehydom a medzi dávkou SO₂ a kys. pyrohroznovou. Obe tieto korelácie sú veľmi signifikantné na hladine významnosti $\alpha < 0,01$. Obe tieto väzby sú pozitívne a veľmi silné. O niečo silnejšiu závislosť má kys. pyrohroznová oproti acetaldehydu, $r = 0,931332$, resp. $0,926361$.

Zistili sme že množstvo acetaldehydu vo všetkých vzorkách veľmi úzko súvisí s dávkou SO₂. Táto závislosť je pozitívna, čím vyššia dávka pridaného SO₂, tým viacej acetaldehydu sa nám vytvorí. Priemerné hodnoty vytvoreného acetaldehydu pre jednotlivé vzorky sú: 97,08 mg.l⁻¹ pri VZ1, 105,32 mg.l⁻¹ pri VZ2 a 102,42 mg.l⁻¹ pri VZ3. Medzi

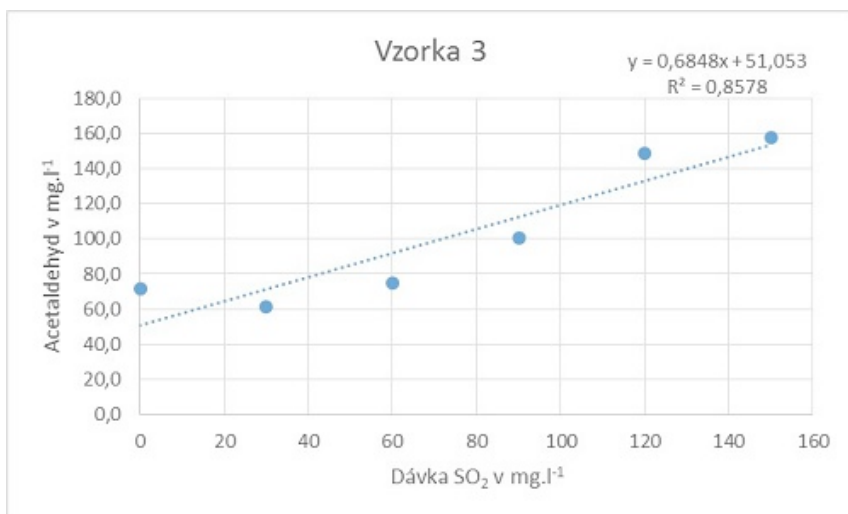
jeho vytvorenými množstvami nie je štatisticky významný rozdiel.



Obrázok 53 Spojnica trendu medzi acetaldehydom a celkovým SO₂ vzorky 1 (Zdroj: vlastný)

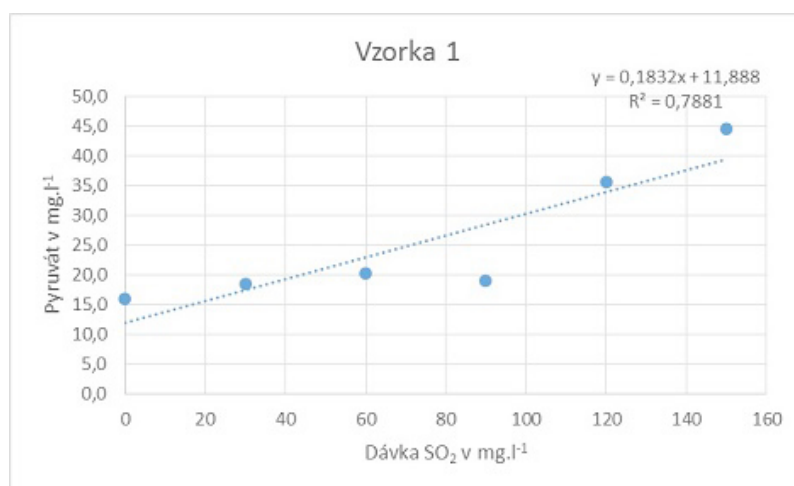


Obrázok 54 Spojnica trendu medzi acetaldehydom a celkovým SO₂ vzorky 2 (Zdroj: vlastný)

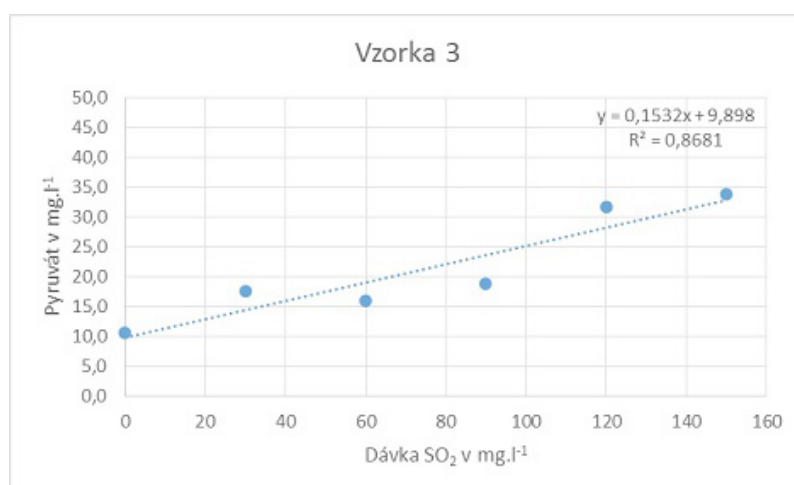


Obrázok 55 Spojnica trendu medzi acetaldehydom a celkovým SO₂ vzorky 3 (Zdroj: vlastný)

Kyselina pyrohroznová vytvorená behom alkoholovej fermentácie vykazuje štatisticky významnú koreláciu s dávkou SO_2 vo vzorke 1 a vzorke 3. S vyššou dávkou SO_2 stúpa aj tvorba kyseliny pyrohroznovej. Vo vzorke 3 je táto korelácia významnejšia ($\alpha < 0,01$) ako vo vzorke 1 ($\alpha < 0,05$). Priemerné hodnoty vytvorenej kys. pyrohroznovej sú $25,60 \text{ mg.l}^{-1}$ pre VZ1, $16,2 \text{ mg.l}^{-1}$ pre VZ2 a $21,38 \text{ mg.l}^{-1}$ pre VZ3. Najvyššie priemerné hodnoty sú vo vzorke 1. Zníženie tvorby kyseliny pyrohroznovej vo vzorke 3 je štatisticky významné. Toto zníženie je možné pripísať vplyvu pridania výživy ku vzorke 3. Zníženie priemernej hodnoty kyseliny pyrohroznovej vo vzorke 2 je štatisticky významné oproti vzorke 1 aj oproti vzorke 3. Vzorka 2 mala proti vzorke 1 dodanú výživu a oproti vzorke 3 bol navyše dodaný vitamín B1 – tiamín. Všetky spomenuté štatisticky významné rozdiely sú významné na hladine $\alpha < 0,05$.



Obrázok 56 Spojnica trendu medzi kys. pyrohroznoovou a celkovým SO_2 vzorky 1
(Zdroj: vlastný)



Obrázok 57 Spojnica trendu medzi kys. pyrohroznoovou a celkovým SO_2 vzorky 3
(Zdroj: vlastný)

Nepodarilo sa preukázať žiadnu významnú koreláciu kyseliny 2-oxoglutarovej

a dávok SO_2 . Takisto nekoreluje s kyselinou pyrohroznovou alebo acetaldehydom. Priemerné hodnoty vytvorenej kyseliny 2-oxoglutárovej sú $83,1 \text{ mg.l}^{-1}$ pri VZ1, $69,93 \text{ mg.l}^{-1}$ pri VZ2 a $56,57 \text{ mg.l}^{-1}$ pri VZ3. Rozdiely medzi týmito hodnotami, nie sú štatisticky významné.

6 Diskusia

Senzorická analýza vína nám preukázala dôležitosť oxidu siričitého ako zlúčeniny ktorá sa viaže s acetaldehydom a chráni arómu vína. Vzorky s nízkymi hodnotami oxidu siričitého mali oxidatívny charakter. Bolo to spôsobené veľkým množstvom voľného acetaldehydu, ktorý ich negatívne senzoričky ovplyvňoval. Oxid siričitý viaže acetaldehyd, chráni arómu vína a odstraňuje pach zvetralého jablka (MICHLOVSKÝ, 2012).

Analýza takisto potvrdila, že oxid siričitý nám chráni víno pred baktériami aj vo svojej viazanej forme. Ako dôkaz môžeme uviesť vzorky vína s celkovým obsahom oxidu siričitého do 10 mg.l^{-1} , ktoré vykazovali silné znaky myšiny. Pri vyšších dávkach oxidu siričitého aj keď len vo viazanej forme, vína touto vadou postihnuté neboli. Spôsobujú ju mliečne baktérie rodu *Lactobacillus* a sú k nej náchylné vína s nízkym obsahom oxidu siričitého a vyšším pH (FUGELSANG a EDWARDS, 2007). Oxid siričitý aj vo viazanej forme s acetaldehydom alebo s kyselinou pyrohroznovou má antibakteriálne účinky. Je síce 5-10 krát menej účinný ako voľný oxid siričitý, ale vo víne sa ho oproti voľnému SO_2 nachádza niekoľkonásobne viac (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a).

Zistili sme, že dávka oxidu siričitého ktorú aplikujeme do muštu pred kvasením, nám významne ovplyvňuje množstvo celkového oxidu siričitého ktorý máme vo víne. Celkový oxid siričitý stúpa v závislosti na veľkosti tejto dávky. Táto skutočnosť súvisí s tvorbou acetaldehydu, ktorý nám viaže oxid siričitý najsilnejšie zo všetkých skúmaných zlúčenín. Vysokú koreláciu medzi acetaldehydom a celkovým oxidom siričitým preukázal vo svojej práci aj HAMERNÍK (2010).

Množstvo oxidu siričitého ktorý bol do muštu pridávaný pred kvasením nám veľmi významne koreluje s množstvom vytvoreného acetaldehydu. Je to ľahko vysvetliteľné metabolizmom kvasiniek. Kvasinky potrebujú pri alkoholovej fermentácii určité množstvo voľného acetaldehydu. Skrz jeho premenu na alkohol prichádza k regenerácii NAD, ktorý je potrebný pri začiatkových krokoch alkoholovej fermentácie. Kým nie je v mušte určité množstvo voľného acetaldehydu, alkoholová fermentácia neprebíha. Kvasinky ho vytvárajú spolu s glycerolom a kyselinou pyrohroznovou pri glyceropyruvátovej fermentácii. Acetaldehyd je produkovaný dotedy, kým sa naň nenaviaže všetok voľný oxid siričitý. Preto je glyceropyruvátová fermentácia najvýznamnejším producentom acetaldehydu. (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a). Táto závislosť množstva vytvoreného acetaldehydu od dávky SO_2 do muštu bola veľmi silná vo všetkých vzorkách, bez rozdielu pridanej výživy.

Kyselina pyrohroznová vzniká takisto ako acetaldehyd pri glyceropyruvátovej

fermentácii, ale tiež pri alkoholovej fermentácii, kde je predstupňom acetaldehydu. Množstvo vytvorenej kyseliny pyrohroznovej tiež ovplyvňuje dávka SO₂ do muštu. Potvrdili sme to u 2 z 3 vzoriek, pričom jedna z nich bola vysoko významná a druhá významná. Nepotvrdenie sa tohto javu v treťom prípade bolo dôsledkom prídania tiamínu do muštu. Tiamín množstvo kyseliny pyrohroznovej ktoré bude vytvorené, znižuje.

Tiamín je dôležitou súčasťou dekarboxylázy, ktorá premieňa kyselinu pyrohroznovú na acetaldehyd. Jeho nedostatok môže zkomplikať až zastaviť alkoholovú fermentáciu (FURDÍKOVÁ a MALÍK (2007)). Vychádzajúc z tohto tvrdenia, si myslíme, že dostatočné množstvo tiamínu poskytnuté kvasinkám bude predchádzať zastaveniu v tomto kroku alkoholovej fermentácie a výsledkom bude tvorba nižšieho množstva kyseliny pyrohroznovej. Aj ŠVEJCAR (2000) tvrdí, že tiamín pri alkoholovej fermentácii znižuje tvorbu kyseliny pyrohroznovej a kyseliny 2-oxoglutárovej. Ten istý autor (2000) tiež tvrdí, že hoci kvasinky majú schopnosť tiamín syntetizovať, toto množstvo nestačí a je ho treba do muštu aj pridať. Pozitívny účinok tiamínu na alkoholovú fermentáciu podporuje dostatok asimilovateľného dusíka. Asimilovateľný dusík tiež čiastočne kompenzuje nedostatok tiamínu (MINÁRIK, 2005). Toto tvrdenie vysvetľuje štatisticky významné zníženie produkcie kyseliny pyrohroznovej v mušte s pridanou výživou (VZ3), oproti muštu bez prídavku výživy (VZ1).

Nepodarilo sa preukázať koreláciu medzi dávkou SO₂ a množstvom kyseliny 2-oxoglutárovej. Táto kyselina vzniká v Krebsovom cykle, kde je počiatočným substrátom kyselina pyrohroznová. Enzým 2-oxoglutarát dehydrogenáza, ktorý kyselinu 2-oxoglutárovú dekarboxyluje na sukcinát vykazuje veľmi slabú aktivitu za anaeróbných podmienok (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a). Jej tvorba preto zrejme nebude mať súvislosť s množstvom SO₂ pridaného do muštu. Domnievame sa, že môže byť ovplyvňovaná intenzitou Krebsovho cyklu a aeráciou muštu.

7 Záver

Táto práca bola zameraná na problematiku oxidu siričitého a karbonylových zlúčenín. Oxid siričitý má vo vyšších dávkach nepriaznivé účinky na ľudské zdravie, preto je jeho množstvo vo víne limitované legislatívou. S týmto súvisia karbonylové zlúčeniny - látky viažuce oxid siričitý. Oxid siričitý je najúčinnjší vo svojej voľnej forme, pokiaľ je viazaný na tieto látky, musí byť do vína opätovne pridaný aby bola zabezpečená ochrana vína.

V tejto práci bolo dokázané, že množstvo oxidu siričitého ktorý je pridaný do muštu pred kvasením, výrazne ovplyvňuje množstvo vytvoreného acetaldehydu, čo je zlúčenina zodpovedná za viazanie najväčšieho množstva oxidu siričitého vo víne. Bolo preukázané, že dávka oxidu siričitého ovplyvňuje aj množstvo vytvorenej kyseliny pyrohroznovej. Nepodarilo sa preukázať žiadny štatisticky významný vplyv sírenia na tvorbu kyseliny 2-oxoglutánovej.

Naopak, práca potvrdila, že vplyv prídavku tiamínu do muštu tvorbu kyseliny pyrohroznovej znižuje. Tiež potvrduje, že vplyv tiamínu môže byť čiastočne nahradený dodanou výživou pre kvasinky.

8 Súhrn

Táto práca bola zameraná na vplyv veľkosti dávok oxidu siričitého do muštu na tvorbu karbonylových zlúčenín. Pojednáva o enologických vlastnostiach oxidu siričitého. V jednotlivých kapitolách sú popísané jeho formy a ich účinky vo víne. Práca sa podrobne venuje karbonylovým zlúčeninám, ktoré sa s oxidom siričitým významne viažu. Pojednáva o ich vzniku a možnostiach ovplyvnenia ich množstva. Venuje sa aj látkam, ktoré môžu oxid siričitý čiastočne nahradiť, a tak znížiť jeho celkové množstvo vo víne.

V samotnom pokuse boli pripravené vzorky vína, ktoré sa líšili veľkosťou dávky oxidu siričitého pridaného do muštu pred kvasením. Zároveň boli do muštu aplikovali odlišné formy výživy. Vo vzorkách boli pomocou HPLC analýzy stanovené koncentrácie acetaldehydu, kyseliny pyrohroznovej a kyseliny 2-oxoglutárovej. V tejto práci sa podarilo preukázať vplyv počiatocnej dávky oxidu siričitého na množstvo vytvoreného acetaldehydu a kyseliny pyrohroznovej. Tiež bol preukázaný vplyv prídavku tiamínu do muštu, ktorý tvorbu kyseliny pyrohroznovej znižuje.

Kľúčové slová: oxid siričitý, acetaldehyd, kyselina pyrohroznová, kyselina 2-oxoglutárová

9 Resumé

The thesis focuses on the effect of dose levels of sulfur dioxide in the must on the formation of carbonyl compounds. Furthermore, it is concerned with oenological properties of sulfur dioxide, its forms and effects on wine. The thesis corroborates in detail carbonyl compounds bind sulfur dioxide and discusses their origin and various options to affect their quantity. Substances that may partially replace sulfur dioxide and thereby reduce its total quantity in wine are also debated.

Experimental part of the thesis involved samples of wine differing in quantity of sulfur dioxide added to the must before fermentation and in forms of nutrition. Using the HPLC analysis, concentrations of acetaldehyde, pyruvic acid, and 2-oxoglutaric acid were determined. The experiment demonstrated the effect of initial doses of sulfur dioxide on the amount of generated acetaldehyde and pyruvic acid. The effect of addition of thiamine, which reduces formation of pyruvic acid, was also shown.

Key words: sulfur dioxide, acetaldehyde, pyruvic acid, 2-oxoglutaric acid

10 Literárne zdroje:

- BALÍK, J. *Vinařství: návody do laboratorních cvičení*. 3., nezměn. vyd. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2006, 96 s. ISBN 80-715-7933-5.
- BARBE, J. Ch., G. DE REVEL a A. BERTRAND. Gluconic Acid, Its Lactones, and SO₂ Binding Phenomena in Musts from Botrytized Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, vol. 50, issue 22, s. 6408-6412. DOI: 10.1021/jf020412m. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf020412m>
- BARBE, J. C., G. DE REVEL, A. JOYEUX, A. LONVAUD-FUNEL a A. BERTRAND. Role of Carbonyl Compounds in SO₂ Binding Phenomena in Musts and Wines from Botrytized Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, vol. 48, issue 8, s. 3413-3419. DOI: 10.1021/jf991359d. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf991359d>
- BAROŇ, M. 2009: *Možnost rapidního zvýšení účinnosti oxidu siřičitého pomocí C8 a C10 mastných kyselin*. Vinařský obzor, vol. 102, no. 11, pp. 509-510. ISSN 1212-7884.
- BAROŇ, M.; BÁBÍKOVÁ, P. 2011: *Saturated higher fatty acids as a means of inhibiting alcoholic fermentation and sulphur dioxide reduction in wine*. Mitteilungen Klosterneuburg, vol. 61, no. 3, pp. 158-166. ISSN 0007-5922.
- BAROŇ, M. 2013: *Nový pomocník při výrobě vína: Dimetyldikarbonát*. Vinařský obzor, vol. 106, no. 11, pp. 570-572. ISSN 1212-7884.
- BLOUIN, J. *Contribution à l'étude des combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les mouts et les vins*. Bordeaux, 1965. These Docteur-Ingenieur. Université de Bordeaux.
- COSTA, A.; BARATA, A.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. 2008: *Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms*. Food Microbiology, vol. 25, no. 2, pp. 422-427. ISSN 0740-0020.
- DHARMADHIKARI M.R., *Oxidation and Management Of Sulfur Dioxide in Vine*, Prezentované na: Iowa Wine Growers Association Annual Meeting, 28.1.2006. Dostupné z <http://viticulture.hort.iastate.edu/info/06iawgmtg/oxidationoso2mgt.pdf>
- DIVOL, B.; STREHAIANOE, P.; LONVAUD-FUNEL, A. 2005: Effectiveness of dimethyldicarbonate to stop alcoholic fermentation in wine. Food Microbiology, vol. 22, no. 2-3, pp. 169-178. ISSN 0740-0020.
- DIVOL, B., M. TOIT a E. DUCKITT. Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. Applied Microbiology and Biotechnology [online]. 2012, vol. 95, issue 3, s. 601-613 [cit. 2013-04-01]. DOI: 10.1007/s00253-012-4186-x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-012-4186-x>

- EDER, R. a kol.. *Vady vína*. Vyd. 1. Valtice: Národní vinařské centrum, 2006, 263 s. ISBN 80-903-2016-3.
- ELIAS, R. J., V. F. LAURIE, S. E. EBELER, J. W. WONG a A. L. WATERHOUSE. Analysis of selected carbonyl oxidation products in wine by liquid chromatography with diode array detection. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2008, vol. 626, issue 1, s. 104-110 [cit. 2015-04-17]. DOI: 10.1016/j.aca.2008.07.048. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267008013883>
- FARKAŠ, J. *Biotechnológia vína*. 2. vyd. Bratislava: ALFA, 1983, 984 str., 63-076-83
- FUGELSANG, K. a Ch. G. EDWARDS. 2007. *Wine microbiology: Practical Applications and Procedures*. 2nd ed. / . New York, NY: Springer, xx, 393 p. ISBN 03-873-3349-5.
- FURDÍKOVÁ, K. a F. MALÍK. Kolobeh síry vo víne. *Vinařský obzor: Odborný časopis pro vinohradnictví, sklepní hodpodářství a obchod vínem /*. Velké Bílovice: Svaz vinařů České republik, 2007, roč. 100, 7-8, s. 370-373.
- HAMERNÍK, J. 2010. *Vplyv šírení na vznik sloučenin vázajících SO2 ve vině*. Lednice. Dostupné také z: http://is.mendelu.cz/zp/index.pl?podrobnosti_zp=22483. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně.
- HAN, G., H. WANG, M. R. WEBB a A. L. WATERHOUSE. A rapid, one step preparation for measuring selected free plus SO2-bound wine carbonyls by HPLC-DAD/MS. *Talanta*. 2015, vol. 134, s. 596-602. [cit. 2015-04-17] DOI: 10.1016/j.talanta.2014.11.046. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914014009576>
- HRONSKÝ, V. *Spríevodca vínami Slovenska*. 1. vyd. Bratislava: Slovart, 2014, 263 s. ISBN 978-80-556-0850-1.
- JOKIE BAKER, R. J. *Wine Flavour Chemistry*. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2011. ISBN 9781444345995.
- LAHO L., MINÁRIK E., NAVARA A., *Vinárstvo, chémia, mikrobiológia a analytika vína*, Bratislava 1970, 426 str., 64-054-70
- LIMMER, A. The chemistry of post-bottling sulfides in wine. *Chemistry in New Zealand*, 2005, 69.3: 2, Dostupné z: http://www.nzic.org.nz/CiNZ/articles/Limmer_69_3.pdf.
- KAMENÍČEK, J. *Anorganická chemie*. 4. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009, 316 s. ISBN 978-80-244-2387-6.
- KRATOCHVIL, F. *1000 a 111 pojmů o víně, révě vinné a vinařství, aneb, Breviř enofila*. Vyd. 1. Mikulov: Moravín, svaz moravských vinařů, 2013, 344 s. ISBN 978-80-260-5123-7.
- KRÄTSMÁR-ŠMOGROVIČ, J.. *Všeobecná a anorganická chémia: učebnica pre*

- farmaceutické fakulty*. Martin: Vydavatelství Osveta, 1994, 398 s. Vysokoškolské učebnice (Vydavatelství Osveta). ISBN 8021705329.
- MICHLOVSKÝ, M. *Lexikon chemického složení vína: příručka praktického vinaře*. Vydání 1. Rakvice: Vinselekt Michlovský, 2014, 262 s. ISBN 978-809-0531-925.
- MICHLOVSKÝ, M. *Oxid siřičitý v enologii*. Vyd. 1. Rakvice: Vinselekt Michlovský, 2012, 151 s. ISBN 978-80-905319-0-1.
- MINÁRIK, E. 2005: *Význam tiaminu v alkoholovej fermentácii*. Vinařský obzor, vol. 98, no. 11, pp. 563. ISSN 1212-7884.
- MOLIKI, D. a S. SHARMA. HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC). [online]. 2014 [cit. 2015-04-17]. Dostupné z: http://www.academia.edu/8873343/High_Performance_Liquid_Chromatography
- MORENO-ARRIBAS, M. a M. POLO. *Wine chemistry and biochemistry*. New York: Springer, 2009, 735 p. ISBN 9780387741185-.
- MORENO, J. a R. PEINADO. *Enological chemistry*. 1st ed. Waltham, MA: Academic Press, 2012, xi, 429 p. ISBN 01-238-8438-1.
- NARIADENIE KOMISIE (ES) č . 606/2009 [online]. [cit. 2015-04-21]. Dostupné z: http://www.svssr.sk/dokumenty/legislativa/nk_0606_2009.pdf
- OSBORNE, J.P., R. MIRA DE ORDUNA, G.J. PILONE a S.-Q. LIU. Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2000, vol. 191, issue 1, s. 51-55. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09318.x. Dostupné z: <http://femsle.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09318.x>
- POLÁČEK, Š., J. KULICH, J. TOMÁŠ a A. VOLLMANNOVÁ. *Anorganická chémie*. 1. vyd. Nitra: Slovenská poľnohospodárka univerzita, 2003. ISBN 80-8069-137-1.
- POSPÍŠILOVÁ, D., D. SEKERA a T. RUMAN. *Ampelografia SLOVENSKA*. Bratislava: Výskumná s šľachtiteľská stanica vinárska a vinohradnícka Modra, n.p., 2005, 368 s. 1. ISBN 80-969350-9-7.
- RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBÉREAU-GAYON P. A SUDRAUD P., *Sciences et Techniques du Vin*, Vol. 4: *Clarification et Stabilisation. Matériels et Installation*. Dunod, Paris, 1977
- RIBÉREAU-GAYON, P., D. DUBOURDIEU, B. DONÉCHE a A. LONVAUD. *Handbook of enology: Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, 2006a, 2 v. ISBN 04-700-1037-1
- RIBÉREAU-GAYON, P., D. DUBOURDIEU, Y. GLORIES a A. MAUJEAN. *Handbook of enology: Volume 2 The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, 2006b, 2 v. ISBN 04-700-1037-1

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

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1388762/pdf/hw0309.pdf>

SMERNICA 2000/13/ES EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY: o aproximácii právnych predpisov členských štátov, týkajúcich sa označovania, prezentácie a reklamy potravín. In: 2000. Dostupné z: http://www.biznis.sk/data/files/670_2000_13_es.pdf

SOTOLÁŘ, R. *Multimediální atlas podnožových, moštových a stolních odrůd révy*. Lednice: Ústav vinohradnictví a vinařství Zahradnická fakulta v Lednici, 2006. Dostupné z: http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/556/ustav_556/atlas_reva/atlas_reva.pdf

STEIDL, R. *Sklepní hospodářství*. V českém jazyce vyd. 2., aktualiz. Překlad Jiří Sedlo. Valtice: Národní vinařské centrum, 2010, 309 s. ISBN 978-80-903201-9-2.

ŠVEJCAR V. 2000: *Úprava moštů před kvašením*. Vinařský obzor, vol. 93, no. 9, pp. 311. ISSN 1212-7884.

ŠVEJCAR V. 2002: *Úzajištění hladkého průběhu kvašení moštů prava moštů*. Vinařský obzor, vol. 95, no. 9, pp. 421. ISSN 1212-7884.

THRELFALL, R. T.; MORRIS, J. R. 2002: *Using Dimethyldicarbonate to Minimize Sulfur Dioxide for Prevention of Fermentation from Excessive Yeast Contamination in Juice and Semi-Sweet Wine*. *Journal of Food Science*, vol. 67, no. 7, pp. 2758–2762. ISSN 1750-3841.

VELÍŠEK, J. a J. HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin 2*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 623 s. ISBN 978-80-86659-16-9.

USSEGLIO-TOMASSET L., *Chimie oenologique*, 2. vydanie, Techniques & documentation, Paris, 1995

11 Zoznam obrázkov

Obrázok 1 <i>Vznik SO₂ spaľovaním síry (POLÁČEK a kol., 2003)</i>	10
Obrázok 2 <i>Vznik SO₂ pražením pyritu (POLÁČEK a kol., 2003)</i>	10
Obrázok 3 <i>Rovnica popisujúca viazanie kyslíka s SO₂ (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a)</i>	14
Obrázok 4 <i>Rozpúšťanie oxidu siričitého za vzniku hydrogénsiričitanového iónu (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a)</i>	15
Obrázok 5 <i>Rozpúšťanie oxidu siričitého za vzniku siričitanové iónu (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a)</i>	16
Obrázok 6 <i>Zobrazenie percentuálneho zastúpenia možných foriem SO₂ pri zmene pH. Vidíme zdôraznené pH vína a disociačné konštanty. (DIVOL a kol., 2012)</i>	16
Obrázok 7 <i>Vzorec na výpočet percentuálneho zastúpenia molekulárneho SO₂ vo víne (KRÁTSMÁR-ŠMOGROVIČ, 1994)</i>	17
Obrázok 8 <i>Pomer medzi molekulárnym SO₂ a iónom HSO₃⁻, vzhľadom na pH, pri teplote 20°C (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006a)</i>	17
Obrázok 9 <i>Vplyv teploty a alkoholu na disociačnú konštantu pK₁ kyseliny siričitej (USSEGLIO-TOMASSET, 1995).</i>	18
Obrázok 10 <i>Vplyv alkoholu a teploty na percentuálne zastúpenie molekulárneho SO₂ (USSEGLIO-TOMASSET, 1995)</i>	18
Obrázok 11 : <i>Schéma reakcie hydrogénsiričitanového iónu s aldehydom (RIBÉREAU- GAYOUN a kol., 2006a)</i>	19
Obrázok 12 <i>Schéma reakcie hydrogénsiričitanového iónu s ketónom (RIBÉREAU- GAYOUN a kol., 2006a)</i>	19
Obrázok 13 <i>Zobrazenie vzťahu medzi jednotlivými zložkami oxidu siričitého v roztoku (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 1977)</i>	20
Obrázok 14 <i>Vplyv ionizačnej konštanty K na väzbu látok s SO₂ (BLOUIN, 1965)</i>	21
Obrázok 15 <i>Reakcia acetaldehydu s hydrogénsiričitanovým iónom za vzniku kyseliny acetaldehydsiričitej (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a)</i>	21
Obrázok 16 <i>Vznik aktívneho acetaldehydu (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a)</i>	25
Obrázok 17 <i>Vznik acetolaktátu (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a)</i>	25
Obrázok 18 <i>Vznik acetoínu reakciou acetaldehydu s aktívnym acetaldehydom (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a)</i>	25
Obrázok 19 <i>Vznik acetoínu dekarboxyláciou acetolaktátu (RIBÉREAU-GAYOUN a kol., 2006a)</i>	25
Obrázok 20 <i>Vplyv dávky lyzozómu na rozvoj mliečnych baktérií po jablčno-mliečnej fermentácii (MICHLOVSKÝ, 2012)</i>	34
Obrázok 21 <i>Dávky SO₂ použité na výrobu mikrovzorkov (Zdroj: vlastný)</i>	40
Obrázok 22 <i>Vzorky mušty pripravené na kvasenie (Zdroj: vlastný)</i>	40
Obrázok 23 <i>Magnetická miešačka s elektródou na meranie pH (Zdroj: vlastný)</i>	41
Obrázok 24 <i>Titrovacia sústava a roztok na stanovenie SO₂ (Zdroj: vlastný)</i>	44
Obrázok 25 <i>Degustačný hárok použitý pri hodnotení (Zdroj: vlastný)</i>	44
Obrázok 26 <i>HPLC (Zdroj: vlastný)</i>	46
Obrázok 27 <i>Gradientový program (Zdroj: vlastný)</i>	47
Obrázok 28 <i>Tabuľka s obsahom redukujúcich cukrov v mikrovzorkách vína (Zdroj: vlastný)</i>	48
Obrázok 29 <i>Priemerné hodnoty redukujúcich cukrov v závislosti na dávke SO₂ (Zdroj: vlastný)</i>	49
Obrázok 30 <i>Hodnoty SO₂ vo vzorke 1 (Zdroj: vlastný)</i>	49
Obrázok 31 <i>Hodnoty SO₂ vo vzorke 2 (Zdroj: vlastný)</i>	49
Obrázok 32 <i>Hodnoty SO₂ vo vzorke 3 (Zdroj: vlastný)</i>	50

Obrázok 33 Graf hodnôt SO_2 vo víne vzorky 1 (Zdroj: vlastný)	51
Obrázok 34 Graf hodnôt SO_2 vo víne vzorky 2 (Zdroj: vlastný)	51
Obrázok 35 Graf hodnôt SO_2 vo víne vzorky 3 (Zdroj: vlastný)	51
Obrázok 36 Korelácia dávky SO_2 a celkového SO_2 vo vzorke 1 (Zdroj: vlastný)	52
Obrázok 37 Korelácia dávky SO_2 a celkového SO_2 vo vzorke 2 (Zdroj: vlastný)	52
Obrázok 38 Korelácia dávky SO_2 a celkového SO_2 vo vzorke 3 (Zdroj: vlastný)	52
Obrázok 39 Tabuľka senzorickeho hodnotenie vzoriek vína (Zdroj: vlastný).....	53
Obrázok 40 Tabuľka senzorickeho hodnotenie vzoriek vína (Zdroj: vlastný).....	54
Obrázok 41 Porovnanie významu rozdielu hodnôt (Zdroj: vlastný)	54
Obrázok 42 Chromatogram z HPLC analýzy (Zdroj: vlastný).....	56
Obrázok 43 Hodnoty karbonylových zlúčenín.....	56
Obrázok 44 Graf karbonylových zlúčenín vo vzorke 1 (Zdroj: vlastný).....	57
Obrázok 45 Graf karbonylových zlúčenín vo vzorke 2 (Zdroj: vlastný).....	57
Obrázok 46 Graf karbonylových zlúčenín vo vzorke 3 (Zdroj: vlastný).....	57
Obrázok 47 Korelačná matica vzorky 1 (Zdroj: vlastný)	58
Obrázok 48 Parciálna korelácia vzorky 1 (Zdroj: vlastný).....	58
Obrázok 49 Korelačná matica vzorky 2 (Zdroj: vlastný)	58
Obrázok 50 Parciálna korelácia vzorky 2 (Zdroj: vlastný).....	59
Obrázok 51 Korelačná matica vzorky 3 (Zdroj: vlastný)	59
Obrázok 52 Parciálna korelácia vzorky 3 (Zdroj: vlastný).....	59
Obrázok 53 Spojnica trendu medzi acetaldehydom a celkovým SO_2 vzorky 1 (Zdroj: vlastný).....	60
Obrázok 54 Spojnica trendu medzi acetaldehydom a celkovým SO_2 vzorky 2 (Zdroj: vlastný).....	60
Obrázok 55 Spojnica trendu medzi acetaldehydom a celkovým SO_2 vzorky 3 (Zdroj: vlastný).....	60
Obrázok 56 Spojnica trendu medzi kys. pyrohroznovou a celkovým SO_2 vzorky 1 (Zdroj: vlastný).....	61
Obrázok 57 Spojnica trendu medzi kys. pyrohroznovou a celkovým SO_2 vzorky 3 (Zdroj: vlastný).....	61