

MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ

Zahradnická fakulta v Lednici



Vliv kyseliny askorbové na senzorické a
analytické parametry bílých vín

Diplomová práce

Vedoucí práce:

Doc. Ing. Mojmír Baroň, Ph.D.

Vypracoval:

Bc. Jakub Smrčka

Lednice 2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatel : **Bc. Jakub Smrčka**
Studijní program: Zahradnické inženýrství
Obor: Řízení zahradnických technologií
Název tématu: **Vliv kyseliny askorbové na senzorní a analytické parametry bílých vín**
Rozsah práce: 45-50

Zásady pro vypracování:

1. Prostudujte dostupnou literaturu pojednávající o kyselině askorbové v technologii bílých vín.
2. Založte pokus na dvou bílých odrůdách révy vinné s různým dávkováním kyseliny askorbové do rmutu.
Rozborujte pokusné varianty v průběhu výroby vína a v hotovém produktu.
3. Získaná data statisticky vyhodnoťte a vyvoďte doporučení pro praxi.

Seznam odborné literatury:

1. BRANCO, J M. – RIBÉREAU-GAYON, P. Handbook of enology. : The chemistry of wine stabilization and treatments. volume 2. Chichester, West Sussex, England. 2006. ISBN 97804700103962, 97804700103722. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/0470010398>.
2. RIBÉREAU-GAYON, P. – BRANCO, J M. Handbook of enology. : The microbiology of wine and vinifications. volume 1. Chichester, West Sussex, England. 2006. ISBN 97804700103651, 97804700103411. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/0470010363>.
3. BAROŇ, M. Omyly, mýty a polopravdy ve světě enologie – kyselina askorbová. *Vinařský obzor*. 2010. sv. 103, s. 556–557. ISSN 1212-7884.
4. STEIDL, R. *Sklepní hospodářství*. Valtice: Národní salon vín, 2002. ISBN 80-903201-0-4.

Datum zadání diplomové práce: listopad 2013

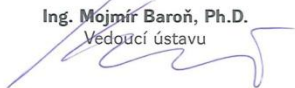
Termín odevzdání diplomové práce: květen 2015

L. S.

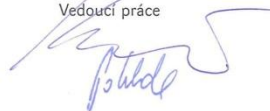
Bc. Jakub Smrčka
Autor práce



Ing. Mojmír Baroň, Ph.D.
Vedoucí ústavu



Ing. Mojmír Baroň, Ph.D.
Vedoucí práce



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

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci:.....

.....
vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/199 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 o tom, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Lednici dne:

.....
podpis

Poděkování

Touto cestou bych chtěl poděkovat především svým rodičům a přítelkyni za pomoc, trpělivost a podporu, bez které by tato práce nemohla vzniknout. Dále patří velké poděkování za pomoc, informace a usměrňování vedoucímu mojí bakalářské práce Doc. Ing. Mojmírovi Baroňovi, Ph.D.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	LITERÁRNÍ ČÁST	9
2.1	VLASTNOSTI KYSELINY ASKORBOVÉ	9
2.2	OXIDACE KYSELINY ASKORBOVÉ	10
2.2.1	Mechanismy oxidace kyseliny askorbové ve víně	10
2.2.2	Oxidace kyseliny askorbové a produkty jejího rozkladu	13
2.2.3	Ionty kovů jako katalyzátory degradace kyseliny askorbové	14
2.3	PRODUKTY DEGRADACE KYSELINY ASKORBOVÉ	16
2.3.1	Produkty pocházející z aerobního rozkladu kyseliny askorbové	17
2.3.2	Produkty pocházející z anaerobního rozkladu kyseliny askorbové	19
2.4	METODY STANOVENÍ KYSELINY ASKORBOVÉ	21
2.4.1	Jodometrická titrace	21
2.4.2	Titrace 2,6-dichlorfenolindofenolem	22
2.4.3	Coulometrické stanovení	22
2.5	OXID SIŘIČITÝ A KYSELINA ASKORBOVÁ	23
2.5.1	Oxid siřičitý a jeho oxidace v bílém víně	23
2.5.2	Interakce oxidu siřičitého a kyseliny askorbové	24
2.5.3	Použití kyseliny askorbové ve víně	27
2.5.4	Přípravky na bázi kyseliny askorbové	28
3	CÍL PRÁCE	32
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
4.1	MATERIÁL	33
4.1.1	Výběr odrůdy	33
4.1.2	Použité účinné látky	34
4.2	METODIKA POKUSU	34
4.2.1	Vinifikace	34
4.2.2	Odběr vzorků	35
4.3	METODY ANALYTICKÉHO MĚŘENÍ	36
4.3.1	Stanovení oxidu siřičitého titrací odměrným roztokem jódu	36
4.3.2	Stanovení kyseliny askorbové a reduktonů	37
4.4	SENZORICKÉ HODNOCENÍ	37
5	VÝSLEDKY	39
5.1	NAMĚŘENÁ DATA	39
5.2	VÝSLEDKY ANALYTICKÉHO ROZBORU	41
5.3	VÝSLEDKY SENZORICKÉ ANALÝZY	50
6	DISKUZE	52
7	ZÁVĚR	54
8	SOUHRN	55
9	SUMMARY	56
10	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	57

11	SEZNAM OBRÁZKŮ	62
12	SEZNAM TABULEK	63
13	SEZNAM GRAFŮ	64

1 ÚVOD

Víno je produkt, který patří k lidskému životu již po staletí. S postupem času se jeho výroba začala značně modernizovat. Je ale jedna látka, bez které se stále výroba vína neobejde, jedná se o oxid siřičitý. Při větším množství však působí negativně na zdraví člověka. V dnešní době se proto hledají látky, které dokážou oxid siřičitý vhodně suplementovat. Jednou z takových látek je právě kyselina askorbová neboli vitamín C. Musíme mít však stále na paměti, že naším cílem je vyrobit víno bez vad a chorob.

Oxid siřičitý, často zkráceně siřičitan nebo SO_2 , je nejdůležitější chemická látka, která zabraňuje oxidaci vína. Kromě antioxidačních účinků má i antimikrobiální účinky. Nicméně negativní dopad SO_2 na zdraví člověka vedl k jeho omezení ve víně Světovou zdravotnickou organizací (WHO) a Mezinárodní organizací pro révu vinnou a víno (OIV) (Li, Wang, Yuan, a Wang, 2005). Kromě toho jeho nadměrné užívání může vést ke zhoršení kvalitativních parametrů u moštů a vína.

Kyselina askorbová je řídce používána jako antioxidant při výrobě vína zejména u bílých vín. Další rozsáhlé studie potvrzují, že kyselina askorbová může mít včetně antioxidačních vlastností i vlastnosti pro-oxidační. Tento stav závisí na podmínkách a množství kyseliny askorbové ve víně (Bradshaw, Cheynier, Scollary, Prenzler, 2003; Bradshaw et al., 2001).

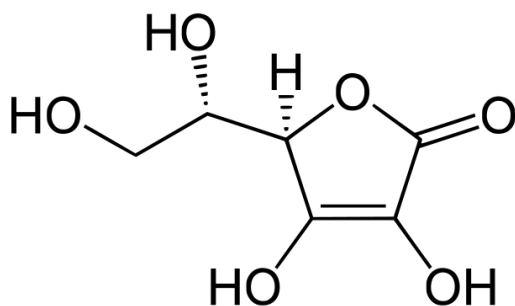
Mnoho nedávných výzkumů naznačuje, že pokud se kyselina askorbová používá v kombinaci s oxidem siřičitým, pak může dojít k rychlejší spotřebě SO_2 a následně oxidací produktu (Bradshaw, Scollary, a Prenzler, 2004; Oliveira, Silva Ferreira, Guedes de Pinho, & Hogg, 2002). Proto je potřeba najít rovnováhu v používání oxidu siřičitého a kyseliny askorbové. Jedním z řešení je používání kyseliny askorbové přímo do hroznového rmutu a moštu.

Je důležité plně pochopit chemii oxidace vína, abychom mohli vyrábět výborné víno, které je zároveň stabilní a zdravotně nezávadné.

2 LITERÁRNÍ ČÁST

2.1 Vlastnosti kyseliny askorbové

Kyselina askorbová neboli vitamín C patří mezi látky rozpustné ve vodě. V pevném skupenství se vyskytuje ve formě bílého prášku. Je to přírodní látka, která se vyskytuje běžně v ovoci a zelenině. Množství kyseliny askorbové v hroznech révy vinné se po rozemletí pohybuje v rozmezí od 10 do 100 mg/l (Rankina, 2002). Kyselina askorbová má molekulovou hmotnost 176,1 g/mol s teplotou tání 193 °C. Molekula byla prvotně nazývána jako kyselina hexuronická a to kvůli schopnosti tvořit sodné a draselné soli.



Obr.1: Vzorec kyseliny askorbové

Člověk je jedním z mála živočišných druhů, který si nedokáže kyselinu askorbovou syntetizovat, i když je pro něj důležitá. Vitamín C je důležitý pro metabolismus aminokyselin. Dále podporuje vstřebávání železa, stimuluje tvorbu bílých krvinek, vývoj kostí, zubů a chrupavek. Podílí se také na antioxidační obraně buňky.

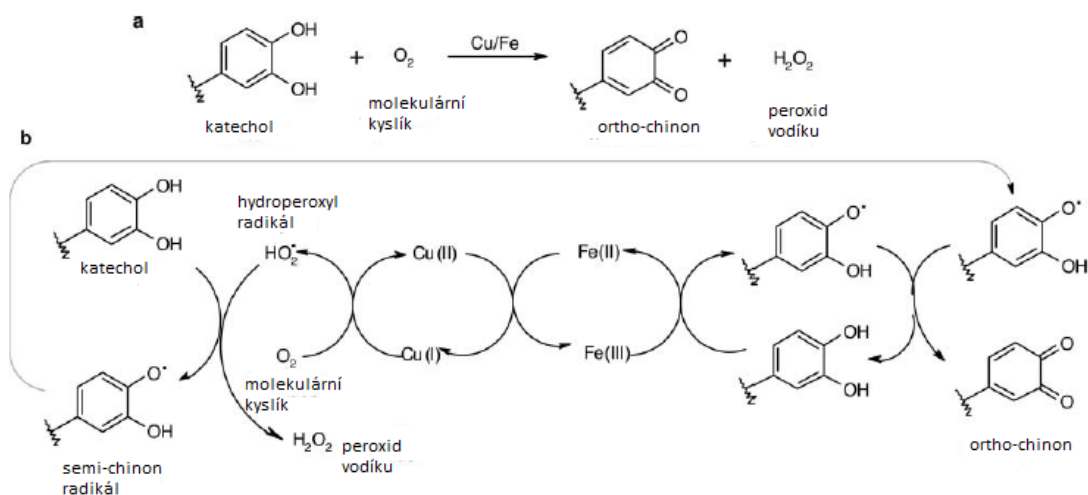
Kyselina L-askorbová se průmyslově vyrábí chemickou syntézou z hroznového cukru. Lze ji také získat přímou extrakcí z ovoce a zeleniny, ale tato metoda je dražší a chemické složení výsledného produktu je stejné.

Dle legislativy EU je to jedna z mála povolených přísad pro ochranu ovocných šťáv a moštů určených pro přímý konzum (SO₂ a kyselina sorbová povoleny nejsou).

2.2 Oxidace kyseliny askorbové

2.2.1 Mechanizmy oxidace kyseliny askorbové ve víně

Kyselina askorbová se používá jako doplněk oxidu siřičitého ve vinařství. Hlavní předností kyseliny askorbové je její rychlá oxidace v podmínkách bílého vína. Tento fakt je založen na schopnosti kyseliny askorbové chránit oxidovatelné složky vína, včetně fenolických a chuťových látek. Při nepřítomnosti kyseliny askorbové dojde ke vniknutí kyslíku do vína a následné reakci s kovovými ionty. To má za následek vznik peroxidu vodíku a ortho-chinonových sloučenin (obr.2A).

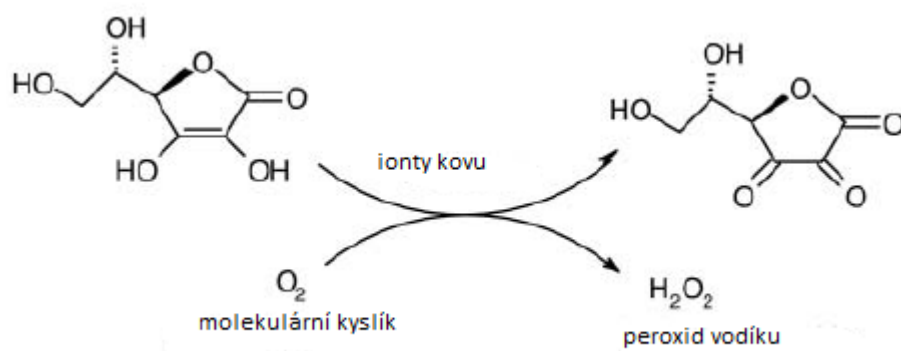


Obr.2: A) celková reakce; B) Navrhovaný mechanismus pro oxidaci fenolických sloučenin ve víně.

Mechanismus oxidace fenolických sloučenin je složitý a je předmětem mnoha výzkumů. (Singleton, 1987; Danilewicz, 2003; Waterhousea Laurie, 2006) navrhli mechanismus, který zahrnuje meziproducty včetně hydroxyperoxyly a semichinonových radikálů před vznikem ortho-chinonových sloučenin a peroxidu vodíku (obr.2B). Za normálních podmínek jsou tyto reaktivní produkty odstraněny z produktu oxidem siřičitým. Pokud nedojde k inhibici těchto látek SO_2 , pak jsou tyto látky zpřístupněny dalším

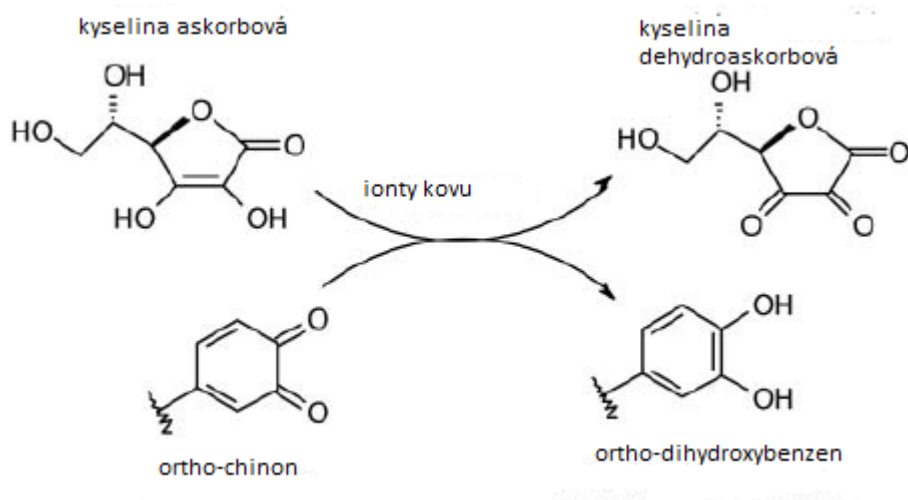
reakcím, mají za následek negativní vliv na barvu, chuť a vůni bílého vína (Singleton, 1987; Peng a kol., 1998; 1999; Bradshaw kol., 2003).

Výhoda kyseliny askorbové jako antioxidantu v bílých vínech spočívá v její vlastnosti vázat molekulární kyslík a tím chránit fenolické sloučeniny před oxidací. Zatímco oxid siřičitý nedokáže tak rychle a efektivně vázat molekulární kyslík (Danielewicz a kol., 2008).



Obr.3: Reakce kyseliny askorbové s molekulárním kyslíkem

Pokud dojde k oxidaci fenolických sloučenin, dokáže kyselina askorbová rychle zvrátit oxidované produkty (t.j. ortho-chinony) zpět do neoxidovaného stavu (Boulton a kol., 1996).

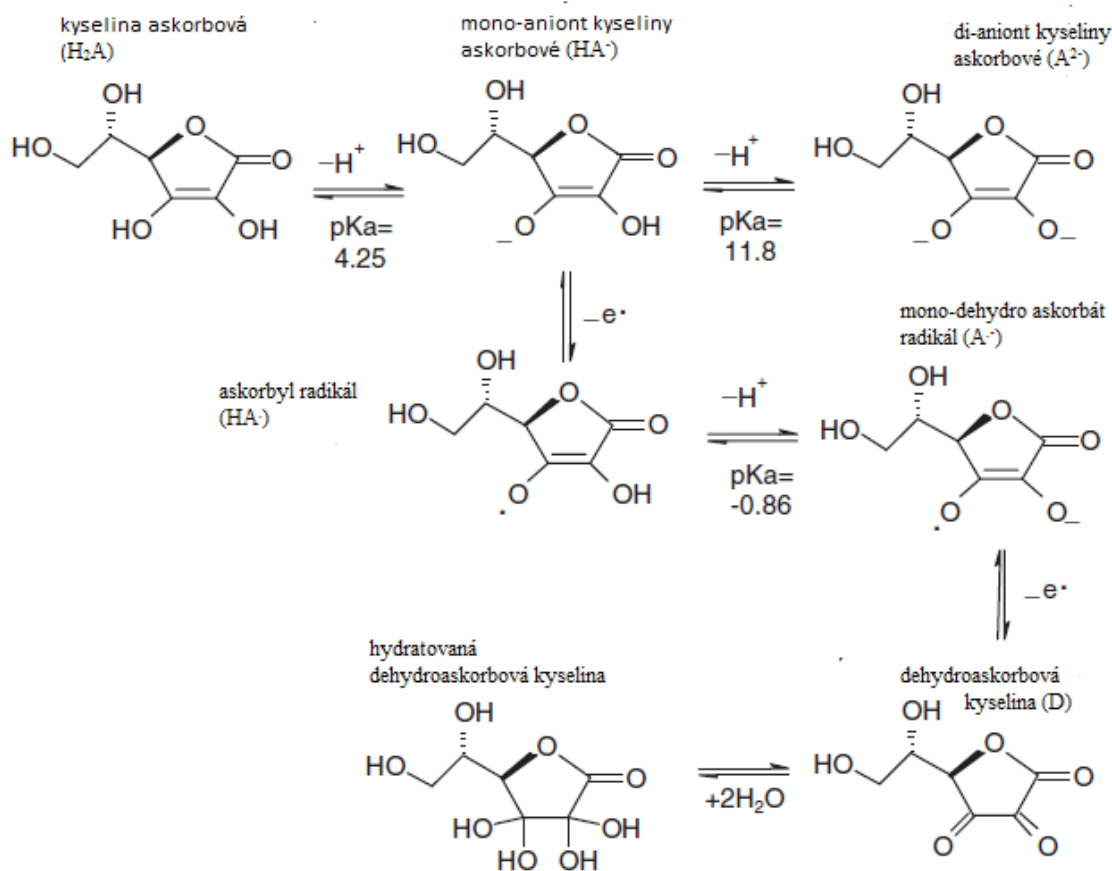


Obr.4: Redukce ortho-chinonových sloučenin na kyselinou askorbovou

Nicméně většina studií provedených v moštu nebo víně nerozeznala rozdíl mezi vázáním kyslíku kyselinou askorbovou a její schopností redukovat chinonové sloučeniny. Přímý důkaz redukce chinonů kyselinou askorbovou byl stanoven ve vodných roztocích oxidací katechinu při pH 4 (Rouet-Mayer a kol, 1990). Další studie prokázala pokles schopnosti redukce chinonových sloučenin kyselinou askorbovou při vzrůstající hodnotě methanolu a klesající hodnotě pH (pH 4,8 vs. pH 3).

V každém případě kombinace kyseliny askorbové a oxidu siřičitého umožňuje rychlejší vazbu molekulárního kyslíku než samotné používání SO₂.

2.2.2 Oxidace kyseliny askorbové a produkty jejího rozkladu



Obr.5: Oxidace kyseliny askorbové a některé produkty jejího rozkladu

Oxidace kyseliny askorbové je proces, při kterém na sebe navazují jednotlivé reakce. V počáteční fázi reakce přijde kyselina askorbová (H_2A) o svůj proton a dojde k tvorbě askorbové kyseliny monoaniontové (HA^-). Tato látka je běžně známá jako askorbát. Askorbát ion může v reakci přijít o svůj další proton za vzniku di-aniontové kyseliny askorbové. Di-aniontová forma nebude však za kyselých podmínek vína upřednostňována. Mono-aniontová forma kyseliny askorbové může podstoupit ztrátu elektronu za vytvoření protonového askorbyl radikálu (HA^\cdot). V rozsahu pH 2-5,5 a za výskytu kyslíku je rychlost oxidace kyseliny askorbové přímo úměrná koncentraci mono-aniontů (Danilewicz, 2003).

Protonovaný askorbyl radikál je pí-radikál delokalizovaný přes vysoce konjugované tri-karboonylové systémy. Delokalizace nepárového elektronu vede ke stabilizaci

radikálu. Askorbyl radikál existuje převážně jako monoaniont. V celém rozmezí pH ve víně se vyskytuje jako semi-dehydroaskorbát nebo mono-dehydroaskorbát ($A^{\cdot-}$). Ztráta elektronu z mono-dehydroaskorbátu vede k tvorbě kyseliny dehydroaskorbové (D).

Tab.1: Formální redukční potenciál na pH stupnici (3,5) kyseliny askorbové, molekulárního kyslíku a katecholu (Danilewicz, 2003)

Reakce	$E^{\circ'}$ (V) (pH 3.5)
$A^{\cdot-} + e^- + H^+ \rightarrow AH^-$	+0.55
$D + e^- \rightarrow A^{\cdot-}$	-0.17
$D + 2e^- + H^+ \rightarrow AH^-$	+0.19
$O_2 + e^- + H^+ \rightarrow HO_2$	-0.09
$HO_2^{\cdot} + e^- + H^+ \rightarrow H_2O_2$	+1.23
$O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$	+0.57
ortho-chinon + $e^- + H^+ \rightarrow$ semi-chinon	+0.32
semi-chinon + $e^- + H^+ \rightarrow$ katechol	+0.85
ortho-chinon + $2e^- + 2H^+ \rightarrow$ katechol	+0.58

Tabulka obsahuje výsledné potenciály dvou elektronových procesů a výsledný celkový dvou-elektronový proces pro každou z těchto sloučenin. Tyto dva naposled znázorněné elektronové procesy je nutno brát v úvahu pro antioxidační působení kyseliny askorbové, znázorněno viz Obr.3.

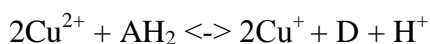
Kyselina askorbová potvrzuje svoji redukční schopnost, preferuje oxidaci oproti jiným reaktivním sloučeninám a přispívá ke snížení ortho-chinonových sloučenin (Zoecklein a kol., 1995; Clark a kol., 2007).

2.2.3 Ionty kovů jako katalyzátory degradace kyseliny askorbové

Úloha kovových iontů při oxidaci kyseliny askorbové je známá více než 90 let. Je dokázáno že Cu^2 a Fe^3 jsou účinnými katalyzátory. I přes četné výzkumy však neexistuje obecně platný mechanismus. Navrhované mechanismy se liší v závislosti na tom, co se měří v průběhu kinetiky (dehydroaskorbová kyselina, peroxid vodíku nebo koncentrace O_2).

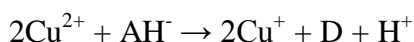
Ve víně existují různé množství stopových kovových iontů v mnoha formách s různou vázací silou. Protože není přijaté žádné jednotné mechanické schéma, je těžké předvídat, jak mohou různé formy kovů odlišně ovlivňovat oxidaci kyseliny askorbové.

Nejnovější zpráva, která podrobně studuje ionty kovů jako katalyzátory kyseliny askorbové je od Shtamm a kol. (1979). Tato rozsáhlá studie se zaměřila jak na aerobní a anaerobní oxidaci kyseliny askorbové, tak i na účinek přísad, které zvyšují tvorbu Cu. Za anaerobních podmínek dochází ke stanovení rovnováhy mezi mědí (Cu) a kyselinou dehydroaskorbovou (D):

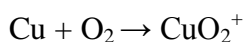


Za aerobních podmínek byl mechanismus formulován takto:

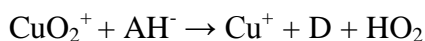
Iniciace



Propagace



Propagace

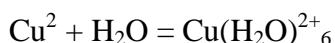


Terminace



Hlavní podstatou tohoto mechanismu je interakce molekulárního kyslíku společně s iontem kovu usnadňující přenos elektronů na kyselinu askorbovou.

Schopnost kovového iontu katalyzovat oxidaci kyseliny askorbové je do značné míry ovlivněna formou iontu, která se vyskytuje v roztoku. Příkladem může být následující vazba:



Tato vazba je ve většině vodných roztoků, tedy i ve víně a mošttech dominantní. V tomto případě působí molekuly vody jako ligandy s kyslíkem vázaným ke kovovému centru. Koordinace ligandu nebo ligandů může mít vliv na katalytickou oxidaci dvěma způsoby. V prvním případě může ligand zabránit dalším molekulám, jako je kyslík nebo kyselina askorbová, vázat se na kovové centrum. V druhém případě může ligand změnit redoxní potenciál kovu, aby přenos byl více či méně obtížný (Miller a kol., 1990).

Častěji se ionty kovu vyskytují v chelátu s jedním nebo více ligandů. Tento proces je o mnoho důležitější. Proto je důležité prozkoumat oxidaci kyseliny askorbové v přítomnosti kovových chelátů. První systematické studie kinetiky chelátu kovů katalyzované kyselinou askorbovou provedl Taki Khan a Martell (1967b). Zjistili, že došlo k inverzní korelaci mezi stabilitou kovového komplexu chelátu a mírou oxidace kyseliny askorbové. To znamená, že rychlost oxidace se snižuje s rostoucí stabilitou komplexu. Další důkazy pro navrhovaný mechanismus pochází z porovnání aktivační energií oxidace v přítomnosti a nepřítomnosti kyslíku. V rámci experimentu bylo zjištěno, že aktivační energie pochází z reakce kovového chelátu na askorbát. Platí zde, že kyslík nehraje žádnou roli v primárních fázích reakce.

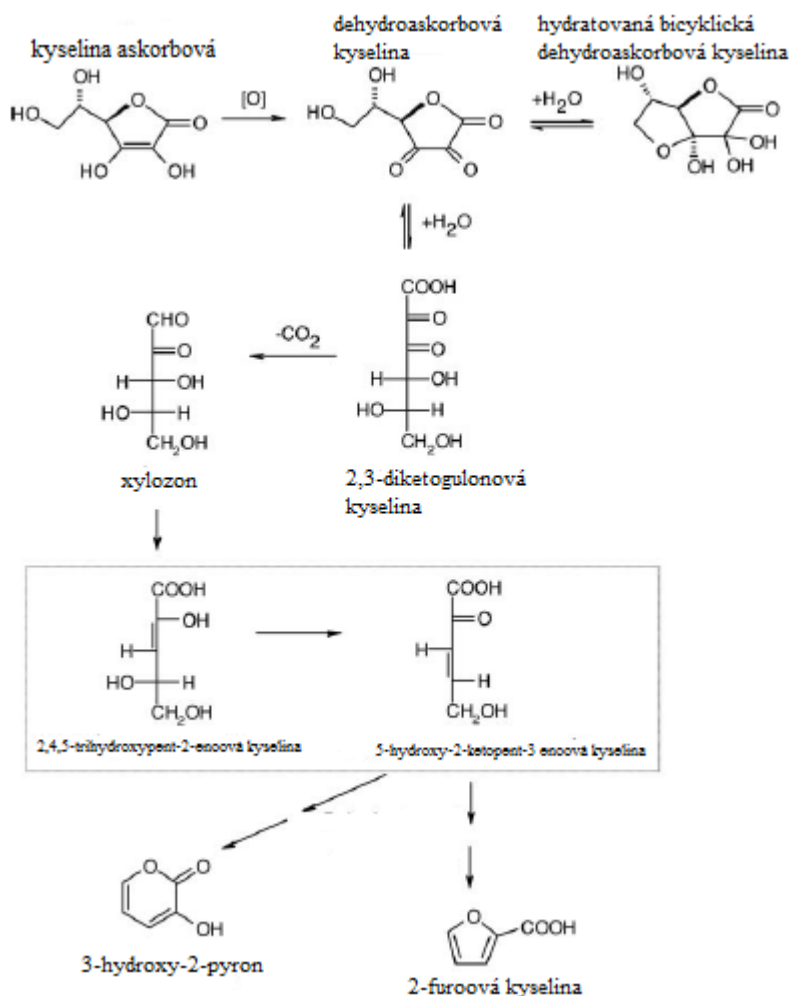
Vliv mědi a železa v oxidaci fenolových sloučenin byla podrobně prozkoumána v práci (Singleton 1987, Danilewicz, 2003; 2007; Waterhouse a Laurie, 2006; Danilewicz a kol., 2008). Kyselina askorbová pravděpodobně zajišťuje redoxní cyklus buď mědi (Cu^2) nebo železa (Fe^3). Vysoký obsah organických kyselin ve víně (kyselina vinná, kyselina jablečná) má vliv na redoxní rovnováhu mezi dvěma formami železa (Fe^3 , Fe^2). Z důvodu toho je upřednostňována forma Fe^3 (Danilewicz, 2003). Snížení kapacity formy Fe^2 bude mít za následek snížení oxidační kapacity Fe^3 formy. Přítomnost silného redukčního činidla jako je kyselina askorbová bude kompenzovat snížení oxidační kapacity Fe^3 formy (Green and Parkins, 1961).

2.3 Produkty degradace kyseliny askorbové

Tato část popisuje degradační produkty kyseliny askorbové ve vodném a kyselém prostředí. A to i za aerobních i anaerobních podmínek.

2.3.1 Produkty pocházející z aerobního rozkladu kyseliny askorbové

Aerobní oxidace kyseliny askorbové vede k tvorbě dehydroaskorbové kyseliny a peroxidu vodíku (Zoecklein et al., 1995). Nejčastější produkty pocházející z aerobního rozkladu kyseliny askorbové a kyseliny dehydroaskorbové v kyselém vodném prostředí jsou 3-hydroxy-2-pyron a 2-furoová kyselina (Yuan a Chen, 1998; Shinoda a kol., 2004).

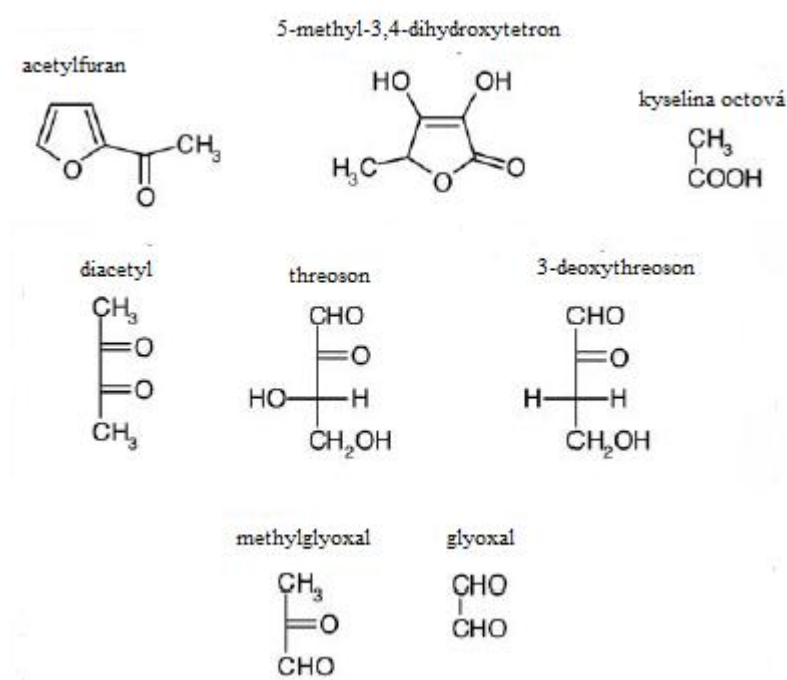


Obr. 6: Aerobní degradace kyseliny askorbové a tvorba 3-hydroxy-2-pyronu a 2-furoové kyseliny (Kimoto et al., 1993; Yuan and Chen, 1998)

Při zkoumání tepelně indukované (60-100 °C) aerobní degradace v oddělených roztocích kyseliny askorbové a dehydroaskorbové bylo prokázáno, že obě sloučeniny 3-hydroxy-2-pyron a kyselina 2-furoová pochází z degradace kyseliny dehydroaskorbové.

Tvorba těchto dvou sloučenin je zobrazena na obr.6. Tato reakce zahrnuje tvorbu kyseliny 2,3-diketogulonové pro vytvoření xylozону (Nath a Bhattathiry, 1955; Whiting a Coggins, 1960).

Přítomnost xylozону při degradaci kyseliny askorbové a dehydroaskorbové byla prokázána studiemi. Samotný xylozon je vstupní branou do mnoha degradačních produktů (Whiting and Coggins 1960; Kurata and Sakurai 1967a; Kurata and Fujimaki, 1976b). Nicméně sloučeniny vytvořené mezi xylozonem a koncovými produkty nebyly doposud s jistotou definovány.



Obr.7: Další produkty degradace kyseliny askorbové v aerobním prostředí

Kromě dvou hlavních sloučenin (hydroxy-2-pyron a kyselina 2-furoová) jsou produkovány ještě další látky v nižších koncentracích. Patří mezi ně 5-methyl-3,4-dihydroxytetron, kyselina octová a acetylfuran. Dalšími látkami jsou α -dikarbonylové sloučeniny (Schulz et al., 2007). Z těchto sloučenin je zajímavý glyoxal, který obsahuje kationty xanthylia. Tato látka reaguje s flavanoly a byla nalezena v bílém víně (Es-Safi et al., 2003).

Jak je patrné z obr. 6, oxid uhlíčitý je dalším produktem oxidace kyseliny askorbové. Prahová hodnota v bílém a červeném víně se pohybuje mezi 0,50 - 0,60 g/l. Při

podobných koncentracích může oxid uhličitý zvýšit svěžest vína (Ough a Amerine, 1988). Průměrná hodnota kyseliny askorbové v produktu je 100 mg/l. Taková hodnota je schopna při rozkladu generovat přibližně 0,025 g/l oxidu uhličitého. Tato hodnota není příliš vysoká, ale dokáže zvýšit prahovou hodnotu oxidu uhličitého. Díky tomu docílíme při přidání kyseliny askorbové při lahvování svěžejších a ovocitějších vín (Kielhöfer and Würdig, 1959).

Je zřejmé, že oxidace kyseliny askorbové v aerobních podmínkách je vysoce komplexní. Proto se reakce liší podle daných podmínek. Degradální produkty kyseliny askorbové se mohou podílet na dalších reakcích ovlivňujících kvalitu výsledného vína (tvorba pigmentu, další oxidační reakce), proto je důležité úplné pochopení jejich reakcí v aerobním prostředí.

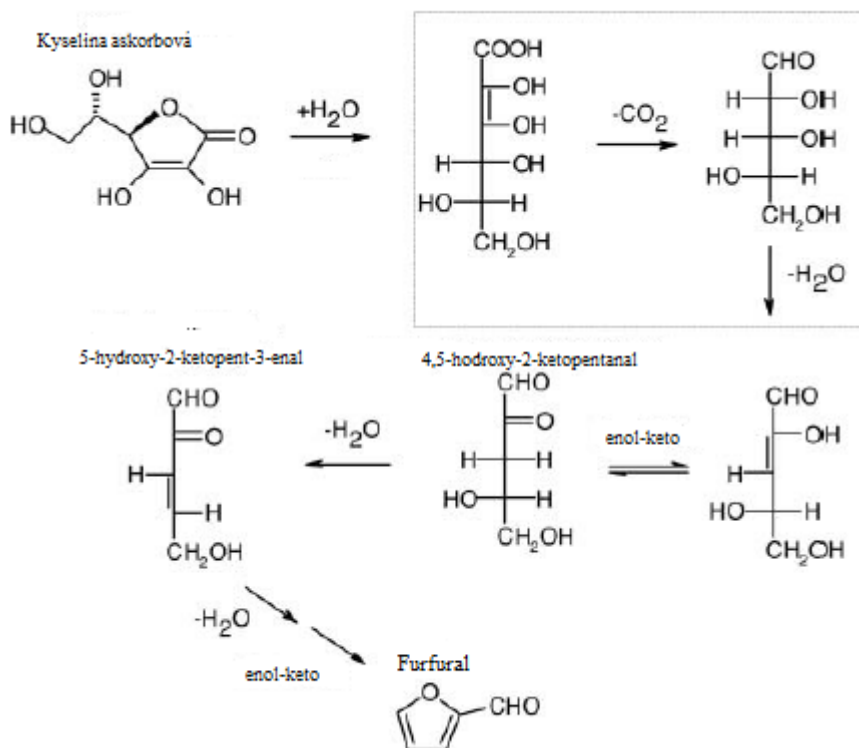
2.3.2 Produkty pocházející z anaerobního rozkladu kyseliny askorbové

Anaerobní degradace kyseliny askorbové zpravidla nevyžaduje odstranění kyslíku z reakčního systému (Kurata a Sakurai, 1967b). Nicméně snížení koncentrace kyslíku má za následek omezení konkurenční aerobní reakce. Je jasné, že při ideální skladovací teplotě vína dochází k aerobní degradaci kyseliny askorbové mnohem rychleji než k degradaci anaerobní. Avšak rychlost anaerobní degradace má vzrůstající tendenci se zvyšováním teploty vína.

Tab.2: Obsah kyseliny askorbové (mg/l) v průběhu anaerobní degradace ve vodném roztoku při různých teplotách (Anmo et al., 1971; Finholt et al., 1965; Niemela, 1987; Rodriguez et al., 1991)

Čas	20°C ^a	30°C ^a	45°C ^a	96°C ^b
0 hodin	100	100	100	100
20 hodin	100	100	100	70
50 hodin	100	100	100	41
1,5 roku	97	87	37	0
3 roky	93	75	14	0

V každém případě nejčastěji zaznamenaným produktem anaerobní degradace kyseliny askorbové je furfural (Bauernfeind a Pinkert, 1970).



Obr.8: Anaerobní degradace kyseliny askorbové za vzniku furfuralu (Shinoda et al., 2004)

Několik studií ukázalo, že tvorba furfuralu je zvýhodněná při nižších hodnotách pH (Loschner et al., 1990; Yuan a Chen, 1998). Ne všechny informace se shodují s tím, že furfural se tvoří výhradně z anaerobního rozkladu kyseliny askorbové. Jeho tvorba je možná i přes oxidační formu degradace kyseliny dehydroaskorbové (Vernin a kol., 1998). Vzájemná přeměna mezi kyselinou askorbovou a kyselinou dehydroaskorbovou je zodpovědná za tvorbu furfuralu z kyseliny dehydroaskorbové (Kurata a Sakurai, 1967a).

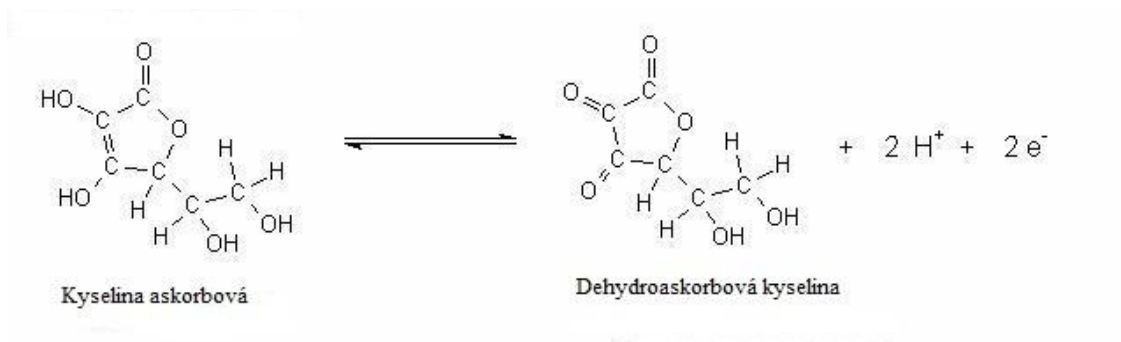
Dalším produktem anaerobní cesty degradace kyseliny askorbové je dikarbonylová sloučenina 4,5-dihydroxy-2-ketopentanal (obr.7), (Schulz et al., 2007). Tato sloučenina je meziprodukt při tvorbě furfuralu během anaerobní degradace kyseliny askor-

bové. Podobně jako studie aerobního rozkladu je i anaerobní degradace kyseliny askorbové závislá na použitých podmínkách. Určitá provázanost experimentálních podmínek bude důležitá pro pochopení degradace ve víně.

2.4 Metody stanovení kyseliny askorbové

2.4.1 Jodometrická titrace

V jodometrii se používá odměrný roztok jodu (I_2) a odměrný roztok thiosíranu sodného ($Na_2S_2O_3$), který v kyselém prostředí stechiometricky redukuje jód na jodid (I^-) a sám se oxiduje na tetrathionan sodný ($Na_2S_4O_6$). Jedna molekula jódu oxiduje dvě molekuly thiosíranu sodného. Kyselinu askorbovou neboli vitamin C ($C_6H_8O_6$) lze v kyselém prostředí stechiometricky oxidovat jódem na kyselinu dehydroaskorbovou ($C_6H_6O_6$), přičemž jedna molekula kyseliny askorbové reaguje právě s jednou molekulou jódu.

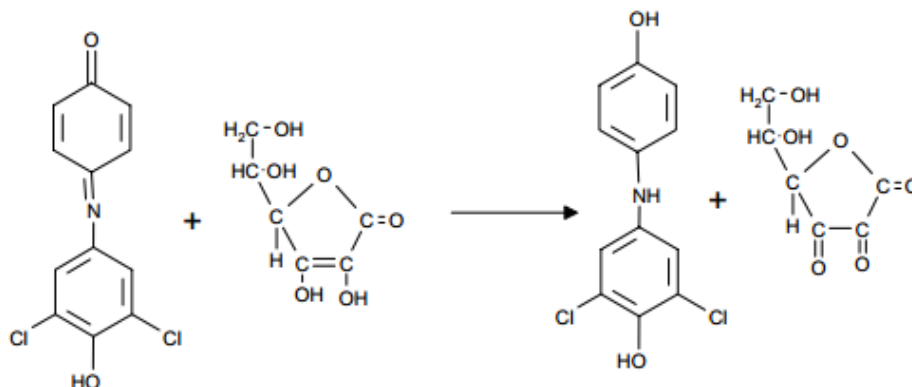


Obr.9: Oxidace kyseliny askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou

Vzorek kyseliny askorbové můžeme přímo titrovat v kyselém prostředí odměrným roztokem I_2 . Před koncem titrace může tato redoxní reakce probíhat relativně pomalu, a proto je nutné v okolí bodu ekvivalence titrovaný roztok opatrně a důkladně promíchat, a tím podpořit reakci. Jako indikátor se při této jodometrické titraci používá roztok škrobu, který svým modrým či hnědým zbarvením indikuje konec titrace.

2.4.2 Titrace 2,6-dichlorfenolindofenolem

Kyselina L-askorbová je enolizovaný lakton kyseliny 2-oxo-L-gulonové. Její chemické stanovení je založeno na její snadné oxidovatelnosti. Titruje se roztokem 2,6-dichlorfenolindofenolu, přičemž se kyselina askorbová oxiduje na kyselinu dehydroaskorbovou a 2,6-dichlorfenolindofenol přechází v bezbarvou leukobazi.



Obr.10: Schéma titrace kyseliny askorbové dichlorfenolindofenolem

2.4.3 Coulometrické stanovení

Další vhodnou metodou je také přímá coulometrická titrace v porézní uhlíkové elektrodě (průtoková chronopotenciometrie). Porézní uhlíková pracovní elektroda se naplní roztokem vzorku a přítomná askorbová kyselina se konstantním proudem oxiduje na dehydroaskorbovou kyselinu. Průběh oxidace se sleduje měřením potenciálu pracovní elektrody (chronopotenciometrie). Během oxidace se potenciál mění pomalu, po úplném zoxidování askorbové kyseliny dochází k jeho skokové změně, což indikuje konec titrace.

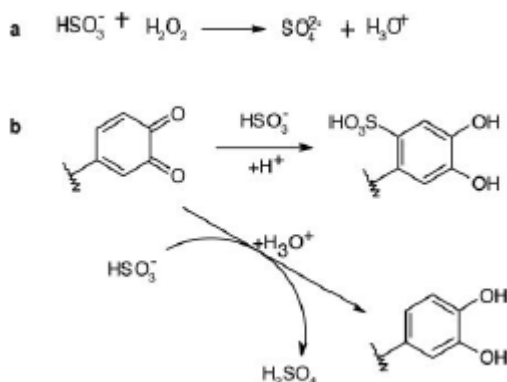
Při této metodě se využívá počítačem řízený elektrochemický analyzátor EcaFlow s porézní průtokovou měřicí elektrodou.

2.5 Oxid siřičitý a kyselina askorbová

2.5.1 Oxid siřičitý a jeho oxidace v bílém víně

Oxid siřičitý je univerzální antioxidační a antimikrobiální látka používaná pro konzervaci vína ve vinařstvích. U vodných roztoků s přítomností kyslíku a iontů kovů může oxid siřičitý podstoupit autooxidaci a dojde ke tvorbě sulfit radikálů (Elias et al., 2009). Nicméně přítomnost fenolů ve víně zabraňuje autooxidaci oxidu siřičitého (Danilewicz, 2007).

Hlavní role oxidu siřičitého jako antioxidentu je zabránění tvorby oxidačních produktů. Tyto produkty vznikají při kovem zprostředkované oxidaci fenolických látek za přístupu molekulárního kyslíku. Další vlastností je odstranění peroxidu vodíku (obr.9a) a ortho-chinonových sloučenin (obr.9b), které by jinak měly negativní dopad na vlastnosti bílého vína (Danilewicz et al., 2008, Makhotkina a Kilmartin, 2009).








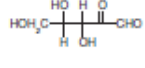


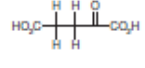
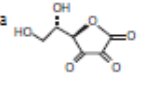
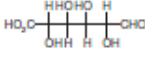
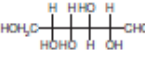
Obr.11: Antioxidační role oxidu siřičitého ve víně

Ochranná úloha oxidu siřičitého je účinná jen za předpokladu vhodné koncentrace. Ta je u bílého vína (pH 3,0-3,3) stanovena na 10mg/l. Tato koncentrace je považována za kritickou úroveň před nástupem nežádoucích znaků (O'brien et al., 2009; Rankine, 2002). Danilewicz (2008) překvapivě prokázal zvýšení spotřeby kyslíku v mode-

lovém systému vína při přidání oxidu siřičitého. Příčinou byla zvýšená oxidace oxidu siřičitého kvůli odstranění ortho-chinonů.

Další rolí oxidu siřičitého je vázat karbonylové sloučeniny (tab.3). Tyto sloučeniny mohou pocházet z hroznů, dále se tvořit během fermentace a nebo v důsledku oxidace vína.

Tab.3: Karbonylové sloučeniny a jejich disociační konstanta ve vazbě s oxidem siřičitým (Betterton and Hoffman, 1987).

Karbonylové sloučeniny	pH	Disociační konstanta (M ⁻¹)	% karbonylové sloučeniny, která není vyvázána ve 25 mg/l volného oxidu siřičitého
Methylglyoxal 	0.7-7.0	1.2×10^{-9}	<< 0.1 to 2.2%
Kyselina glyoxylová 	0.7-2.9	1.4×10^{-8}	<< 0.1 to 0.6%
Acetaldehyd 	3.0	1.5×10^{-6} (3)	0.5%
Glyoxal 	0.7-3.3	3.6×10^{-5}	10 to 18%
Kyselina pyrohroznová 	3.0	1.4×10^{-4} (3)	31%
Xylozon 	3.0	1.4×10^{-4} (3)	31%
Furfural 	3.6 ~ 7.0	2.8×10^{-4} (5) 8.4×10^{-4} (6)	48% 73%
2,5-diketoglukonová kyselina 	3.0	4.5×10^{-4} (3)	59%
2-ketoglutarová kyselina 	3.0	4.9×10^{-4} (3)	61%
Dehydroaskorbová kyselina 	4.0	5.7×10^{-4} (7)	65%
Kyselina galakturová 	3.0	1.6×10^{-2} (3)	98%
Glukóza 	3.8	6.9×10^{-1} (8)	99.96%

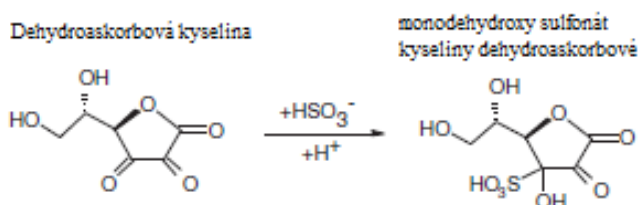
2.5.2 Interakce oxidu siřičitého a kyseliny askorbové

Použití kyseliny askorbové spolu s oxidem siřičitým v bílém víně se zdá být ideální z hlediska snížení molekulárního kyslíku a redukce oxidace fenolových slouče-

nin. Jedná se hlavně o ortho-chinonové sloučeniny a jejich návrat zpět do původního stavu.

Kyselina askorbová má také možnost snižovat ethoxy radikály stejně jako semi-chinon radikály. Vzhledem k tomu, že kyselina askorbová je větší reduktant než fenolové látky, tak dokáže účinně zabránit úniku oxidu siřičitého, který by byl jinak autooxidován (Danilewicz, 2007).

Peroxid vodíku, vytvořený při oxidaci kyseliny askorbové, bude v reakci spolu s oxidem siřičitým vytvářet sulfát (McArdle and Hoffman, 1983). Je také známá reakce oxidu siřičitého s kyselinou dehydroaskorbovou. Při této reakci dochází ke vzniku hydroxy sulfonátu (obr.13).

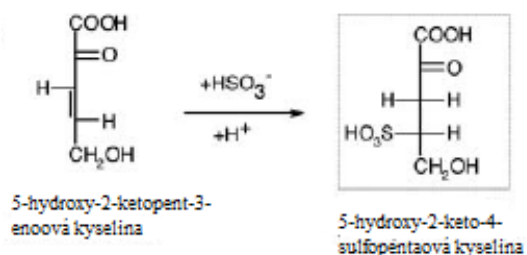


Obr.12: Reakce oxidu siřičitého s kyselinou dehydroaskorbovou

Disociační konstanta kyseliny dehydroaskorbové je 5.7×10^{-4} M. To znamená, že je nízká oproti ostatním látkám, které se vážou na oxid siřičitý (tab.3). Avšak podle pokusů, které prováděl Ingles (1961) se zdá být reakce rychlá.

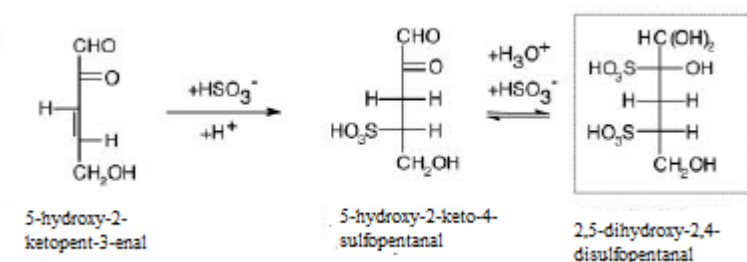
Existuje několik produktů oxidačního rozkladu kyseliny dehydroaskorbové, které mohou vázat oxid siřičitý. Dle tab.3 můžeme vidět, že disociační konstanta těchto látek je malá. To má za následek slabou vazbu na oxid siřičitý. Významná část produktů z degradace kyseliny dehydroaskorbové není vázána na oxid siřičitý. Díky tomu mohou tyto látky podstoupit další degradace i za přítomnosti oxidu siřičitého. Bylo prokázáno, že kyselina dehydroaskorbová se může rozkládat na xylozon i přes přítomnost oxidu siřičitého (Whiting and Coggins, 1960), zatímco přítomnost oxidu siřičitého pomáhá stabilitě xylozonu.

Při aerobní degradaci kyseliny askorbové za přítomnosti oxidu siřičitého dochází k nevratné vazbě a vzniku 5-hydroxy-2-keto-4-sulfopentaové kyseliny (obr.14).



Obr.13: Aerobní reakce oxidu siřičitého a kyseliny askorbové

Je známo, že anaerobní degradace kyseliny askorbové nevratně spotřebovává oxid siřičitý (Wedzicha, 1984; Adams, 1997). K tomu dochází prostřednictvím vytvoření 5-hydroxy-2-ketopent-3-enalu (obr. 8), který se pak podrobí rychlé reakci s oxidem siřičitým za vzniku odpovídajícího sulfoderivátu (obr.15). Tyto sulfosloučeniny mají nižší tendenci k účasti na reakcích hnědnutí (Wedzicha a Garner, 1991).



Obr.14: Produkt anaerobní degradace kyseliny askorbové v reakci s SO₂

I přes známý vliv teploty na rychlost anaerobního rozkladu kyseliny askorbové, nedošlo zatím ke studii, která by potvrdila vliv teploty na rychlost nevratné vazby oxidu siřičitého během anaerobního rozkladu kyseliny askorbové (Anmoa kol, 1971.; Finholt a kol, 1965.; Niemela, 1987; Rodriguez a kol., 1991).

Z aerobního rozkladu kyseliny askorbové je patrné, že předpokládaný poměr kyseliny askorbové a oxidu siřičitého je 1:2. Avšak za předpokladu, že peroxid vodíku a kyselina dehydroaskorbová spotřebují jeden molární ekvivalent SO₂. U anaerobní degradace kyseliny askorbové se předpokládá nižší poměr 1:1, pokud počítáme s tím, že

degradace 5-hydroxy-2-ketopent-3-enalu spotřebuje jeden molární ekvivalent oxidu siřičitého. Bylo popsáno, že skutečný molární poměr kyseliny askorbové a oxidu siřičitého v modelu vína je 1:1,7 (Bradshaw a kol., 2004).

Byl proveden pokus, kde došlo k nalahvování vín odrůd Ryzlink rýnský a Chardonnay s přidavkem kyseliny askorbové a bez ní. Po třech letech došlo k otevření vín a bylo zjištěno, že vína s přidanou kyselinou askorbovou vykazovala mírně zvýšenou hladinu oxidu siřičitého (Skouromounis et al., 2005).

Na druhou stranu v přítomnosti kyseliny askorbové by se dalo očekávat zvýšení množství kyslíku vniknutého do vína. To je způsobeno schopností kyseliny askorbové vázat kyslík rychleji než fenolické sloučeniny ve víně. Tím se zvýší rychlost produkce peroxidu vodíku, který je pohlcován oxidem siřičitým.

Použití kyseliny askorbové bez oxidu siřičitého v modelu bílého vína okamžitě vedlo ke snížení fenolických sloučenin a po vyčerpání kyseliny askorbové také ke zvýšení oxidačního zbarvení (Clark et al., 2008).

2.5.3 Použití kyseliny askorbové ve víně

Jak již bylo zmíněno, jedna z hlavních vlastností kyseliny askorbové spočívá v jejím redukčním charakteru. Je doporučeno používat kyselinu askorbovou v synergii s SO₂ a víno nesmí být po přidání kyseliny askorbové vystaveno silné oxidaci. Dle legislativy EU je maximální povolené množství ve víně 250 mg/l. Roztok pro aplikaci do vína je nutné připravovat v okamžik aplikace a je nutná efektivní homogenizace.

Ve víně jsou známy hodnoty, že 11 mg kyseliny askorbové zneutralizuje 1 mg O₂. To je zhruba 4x větší spotřeba než v případě oxidu siřičitého (Michlovský, 2012). Kyselina askorbová se musí vždy využívat pro vína, která obsahují dostatečné množství oxidu siřičitého. Pokud není přítomen oxid siřičitý, může dojít k nezvratné oxidaci složek vína.

Kyselina askorbová chrání víno před bílým zákalem, který ho může postihnout po manipulaci za přístupu vzduchu, jako je přečerpávání, přeprava, filtrace a především při lahvování. V těchto podmínkách je působení oxidu siřičitého příliš pomalé. Ve velké

části případů způsobuje kyselina askorbová zlepšení chuti u nalahvovaného vína. Kyselina askorbová podporuje u těchto vín svěžest a ovocitost, především u některých typů vín bílých a šumivých. Účinek není výrazný u všech typů vín, avšak nikdy nedojde ke snížení kvality. Pozitivní účinek byl zaznamenán u odrůdových vín Sauvignon, Muškát, Ryzlink rýnský, Veltlínské zelené a v šumivých vínech jako například Prosecca. Kyselina askorbová zlepšuje vjem svěžích, ovocitých vín a vín mladých, která mají hroznové aroma. Důležitou hodnotou je obsah volného oxidu siřičitého. Aby bylo možné sensoricky pozorovat zvýšení ovocitosti a svěžesti, musí se SO₂ pohybovat v rozsahu 20-30 mg/l. Kyselina askorbová přidaná po fermentaci vyžaduje určitá opatření. Vhodná je pro mladá bílá vína, u kterých dochází k lahvování do jednoho roku od sklizně. Přídavek kyseliny askorbové však zvyšuje v nalahvovaných vínech celkové množství SO₂ o 10-20 %. Není vhodná pro bílá a červená vína, která zrála delší dobu na jemných kvasničných kalech nebo v barikových sudech (Ribéreau-Gayon a kol., 1977).

Dávka kyseliny askorbové umožňuje zamezit nebo zpomalit oxidaci moštů katalyzovaných enzymy tyrosinázou a lakázou. Díky tomu je kyselina askorbová využívána jako suplement k oxidu siřičitému na ochranu bílých hroznů a moštů proti oxidaci. Má svou výhodu i u mechanizovaných sklizní, protože nepůsobí na maceraci jako oxid siřičitý.

Byla uskutečněna řada pokusů s přidáváním kyseliny askorbové na ochranu sklizených bílých hroznů. Část studií naznačuje, že mošty jsou ideálně chráněny při přidání kyseliny askorbové společně s SO₂. Jsou zelenější a méně náchylné k oxidaci. Je nutné, aby dávkování kyseliny askorbové doprovázelo omezení kontaktu se vzduchem, vhodná je podpora suchým ledem.

2.5.4 Přípravky na bázi kyseliny askorbové

V dnešní době vzniká povědomí o antioxidačních schopnostech kyseliny askorbové. Proto se na trhu s vinařskou technologií objevuje stále více přípravků na její bázi.

2.5.4.1 Kyselina askorbová

- Složení: Čistá kyselina L- askorbová.

- Použití: Stabilizace chuti a buketu nápojů. Možnost přidávání jako antioxidační preparát do moštu a rmutu.
- Dávkování: Maximální povolená dávka je 15 g/hl. Většinou postačuje dávka 5 g/hl.

2.5.4.2 *Anticasse FN*

- Výrobce: Enartis vinqury.
- Složení: Uhličitan draselný, mléčný kasein, kyselina L-askorbová, disiřičitan draselný.
- Použití: Komplexní směs vhodná pro nápravu oxidovaných vín. Obnovuje svěžest, barvu a působí proti oxidaci. Přípravek má dvojitý efekt. Kyselina askorbová a disiřičitan draselný brání proti oxidaci a kasein inhibuje přítomné oxidační enzymy.
- Dávkování: 20-40 g/hl jako prevence pro mírně oxidované víno
40-60 g/hl pro silně oxidované víno

2.5.4.3 *Citrosol rH*

- Výrobce: Enartis vinqury.
- Složení: Kyselina citronová 46 %, disiřičitan draselný 38 %, kyselina L-askorbová 16,5 %, kyselina metavinná 2,5 %.
- Použití: Přípravek CITROSOL rH působí antioxidačně na složky vína, kyselina askorbová redukuje kyslík rozpuštěný ve víně, ve spojení s kyselinou citrónovou brání tvorbě komplexů železa a tím účinně zabraňuje tvorbě kovových zákalů ve vínech. Díky působení těchto látek dochází ke snížení rH vína. Je posílena i odolnost vůči vzniku krystalických zákalů. Víno si lépe drží svěžest, je méně náchylné na oxidaci. Vhodný k ošetření vín s nízkým obsahem kyselin a alkoholu.

- Dávkování: 10-20 g/hl běžné preventivní ošetření
20-40 g/hl ošetření problémových vín
10 g přípravku dodá do vína 21 mg/l volného SO₂

2.5.4.4 VinProtect

- Výrobce: Erbslöh.
- Složení: siřičitan draselný, kyselina L-askorbová, enologický tanin vysoké čistoty.
- Použití: VinProtect umožňuje účinnou ochranu před oxidací a stará se o stabilizaci aromatických a chuťových komponentů již ve rmutech, moštech nebo později ve vínech. Díky jeho vybraným komponentům má vysoký antioxidační účinek.
- Dávkování: 10 g/hl zdravý materiál (uvolní 25 mg/l SO₂)
20 g/hl problematický materiál (uvolní 50 mg/l SO₂)

2.5.4.5 STARom+

- Výrobce: Lamonthé-abiet.
- Složení: disiřičitan draselný 50 %, kyselina askorbová 30 %, tannin 20 %.
- Použití: Antioxidační ochrana moštů a hroznů. Zvláště účinný je přípravek proti oxidačním enzymům tyrosináza a lakáza.
- Dávkování: 10-25 g/hl rmutu nebo hroznů.

2.5.4.6 Tan Fruit Blanc

- Výrobce: Biopro, s.r.o.
- Složení: katechinické taniny 10 % (extrahované z hroznů a zeleného čaje), disiřičitan draselný 50 %, kyselina L-askorbová 40 %.
- Použití: Prostředek zajišťuje vysoce efektivní antioxidační potenciál, který při použití v moštech zachovává nezměněné původní aroma a tím poskytuje koneč-

nému produktu svěžest a ovocné aroma v širokém spektru. Taniny obsažené v produktu Tan® Fruit Blanc jsou prokyanidického a katechinického původu vyznačující se vysokou reaktivitou vůči proteinům, polyfenoloxidázám a barvicím složkám.

- Dávkování: Hrozny 20-25 g na 100 kg

Mošty 15-20 g/hl

3 CÍL PRÁCE

Tato diplomová práce zkoumá vliv kyseliny askorbové na sensorické a analytické parametry bílých vín. Základním principem práce je využití antioxidační aktivity kyseliny askorbové v různých stádiích vinifikace.

Hlavním cílem práce je tedy srovnání různých dávek kyseliny askorbové u dvou vzorků bílých hroznů (Ryzlink rýnský, Veltlínské zelené), tyto vzorky během vinifikace odebírat a následně odebrané vzorky sensoricky a analyticky vyhodnotit.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Výběr odrůdy

Pokus u této diplomové práce byl prováděn ve Znojemské vinařské podoblasti. Proto jsem zvolil odrůdy, které jsou pro danou oblast typické, a to Ryzlink rýnský a Veltlínské zelené. Zároveň tyto odrůdy mají velice dobré senzorycké výsledky, pokud jsou ošetřovány právě kyselinou askorbovou (ovocitost, svěžest).

Původ odrůdy Ryzlink rýnský není doposud zcela objasněn. Odrůda pravděpodobně vznikla samovolným křížením plané révy vinné a některé z dřívějších odrůd někde v oblasti kolem řeky Rýn v Německu. Odrůda má bujný růst, dřevo dobře vyzrává a má vysokou mrazuvzdornost. Ryzlink rýnský není náročný na typ půdy, ale zato potřebuje pro kvalitní vyzrávání slunné a výhřevné plochy. Hrozny této odrůdy vyzrávají při běžných podmínkách v půlce nebo až na konci října. Víno je velice atraktivní. Vůně může být květinová až lipová, ale také výrazně ovocitá s tóny sušených meruněk. Chuť vína je plná, harmonická a šťavnatá s převážně ovocitou chutí.

Odrůda Veltlínské zelené pravděpodobně vznikla v Rakousku. Vznikla samovolným křížením odrůd Tramín a St. Georgen. Odrůda vyžaduje výborné polohy. Nejvhodnější jsou slunečné, vzdušné a teplé polohy s mírnými svahy. Vzhledem k vysoké plodnosti je náročná na půdu. Vyžaduje hluboké, výživné půdy. Veltlínské zelené je středně náchylné na houbové choroby. Růst této odrůdy je středně bujný až bujný a olisťování keře je středně husté. Hrozny této odrůdy jsou středně velké až velké, mají kuželovitý a křídlatý tvar. Při dobrých podmínkách vyzrávají hrozny v polovině října. Chuť i vůně Veltlínského zeleného je velice variabilní a závisí a podloží dané oblasti. Vína z kamenitých půd jsou více kořenitá až pepřová. Naproti tomu vína z půd hlinitých a těžších jsou hořce mandlová až medová.

4.1.2 Použité účinné látky

- Čistá kyselina askorbová (BS Vinařské potřeby)
- SO₂-disiřičitan draselný (BS Vinařské potřeby)

4.2 Metodika pokusu

4.2.1 Vinifikace

Veltlínské zelené

Hrozny byli ručně sbírané 3. 10. 2014. Zdravotní stav hroznů byl na dobré úrovni, nahnilých bobulí bylo do 15 %. Ihned po transportu hroznů z vinohradu došlo k jejich odstopkování na elektrickém mlýnkoodstopkovači do otevřené 700 litrové kádě. Poté došlo k separaci rmutu do jednotlivých variant. Každá varianta (50 l rmutu) byla rozdělena do uzavíratelné nádoby o objemu 70 l. Vznikly tak tři varianty a kontrola připravené na jednotlivé dávkování kyseliny askorbové a SO₂. Prvním vzorkem byla kontrola, kam byla homogenizována jen dávka SO₂ a to v množství 40 mg/l. První varianta obsahovala střední doporučenou dávku kyseliny askorbové (10 g/hl), druhá dávka měla střední doporučenou dávku kyseliny askorbové a dávku SO₂ (10 g/hl a 40 mg/l) a konečně třetí varianta obsahovala maximální doporučenou dávku kyseliny askorbové (15 g/hl). Po potřebné homogenizaci daných látek došlo k uzavření nádob a dvanácti hodinové maceraci. Lisování mikrovzorků proběhlo na klasickém dřevěném vertikálním lisu. Dalším krokem bylo gravitační odkalení po dobu 24 hodin. Protože cukernatost moštu nedosahovala optimálních podmínek bylo nutné mošt dosladit. Poté následovalo naočkování vzorků čistou kulturou kvasinek Erbslöh Freddo F3. Samotná fermentace jednotlivých vzorků byla realizována ve 30 l skleněných nádobách a trvala 17-20 dní. Po fermentaci následovala ještě aplikace SO₂ u všech variant na 50 mg/l a nalahvování pro senzorickou analýzu.

Ryzlink Rýnský

Zdravotní stav hroznů a silné mechanické poškození ptactvem mělo za následek mechanizovanou sklizeň hroznů dne 7. 10. 2014. Dalším krokem byla separace třapin ze sesbíraného materiálu. Tento krok byl proveden pomocí mlýnkoodstopkovače opět do 700 litrové otevřené kádě. Po rozdělní rmutu do jednotlivých variant došlo k dávkování účinných látek. Stejně jako u předešlé odrůdy kontrola obsahovala pouze SO₂ v dávce 40 mg/l, první varianta obsahovala střední doporučenou dávku kyseliny askorbové (10 g/hl), druhá varianta zahrnovala použití střední dávky kyseliny askorbové a SO₂ (10 g/hl a 40 mg/l) a do třetí varianty byla přidána vysoká dávka kyseliny askorbové (15 g/hl). Ihned po homogenizaci účinných látek došlo k uzavření nádob a dvanáctihodinové maceraci. Dalším krokem bylo lisování na malém dřevěném vertikálním lisu, stejně jako u předešlé odrůdy. Po 24 hodinovém gravitačním odkalení došlo k doslazení moštu řepným cukrem a následné inokulaci kvasinek Erbslöh Freddo F3. Fermentace proběhla ve skleněných nádobách o objemu 30 l a její délka byla přibližně 20-24 dní. Posledním krokem byla aplikace SO₂ a nalahvování kontrolních vzorků pro senzorkou analýzu.

4.2.2 Odběr vzorků

Odběr vzorků probíhal do plastových lahvíček o objemu 200 ml. Během celé vinifikace došlo ke čtyřem odběrům vzorků. První odběr byl realizován po homogenizaci účinných látek do rmutu před samotnou macerací. Ke druhému odběru došlo po dvanáctihodinové maceraci a následnému lisování. K třetímu odebrání vzorků došlo při dokvášení vinifikovaných vzorků a nakonec poslední odběr byl uskutečněn až po přidání dávky oxidu siřičitého po skončení samotné fermentace. Vzorky byly po každém odběru pečlivě popsány a ihned zamrazeny, aby nedošlo k nežádoucí oxidaci. Po odběru všech potřebných vzorků se převezly zamrazené do laboratoře, kde došlo k analytickému rozboru.

4.3 Metody analytického měření

4.3.1 Stanovení oxidu siřičitého titrací odměrným roztokem jódu

Princip:

Odměrný roztok jódu oxiduje volný oxid siřičitý obsažený ve víně, případně po uvolnění oxidu siřičitého z vazeb s karbonylovými sloučeninami v alkoholickém prostředí současně i vázaný oxid siřičitý vína (Balík, 2006).

Pomůcky:

250 ml kónická baňka, 50 ml pipeta, 10 a 25 ml odměrná baňka, 25 ml byreta.

Chemikálie a roztoky:

0,02 mol/l roztok jódu, 1 mol/l roztok NaOH, 0,5 % roztok škrobového mazu, 16 % roztok H₂SO₄.

Postup:

Do kónické baňky o objemu 250 ml bylo odměřeno pipetou 50 ml testovaného vína nebo moštu. Ihned bylo přidáno 10ml 16 % roztoku H₂SO₄ a asi 5ml 0,5 % roztoku škrobového mazu. Poté byl vzorek okamžitě titrován 0,02 mol/l roztokem jódu do modrého zbarvení, které vydrželo nejméně 30 sekund.

Vyhodnocení:

$$x = a \cdot f \cdot 12,8$$

x = mg/l volného oxidu siřičitého vyjádřené v celých číslech

a = spotřeba 0,02 mol/l roztoku jódu na volný oxid siřičitý

f = faktor 0,02 mol/l roztoku jódu

4.3.2 Stanovení kyseliny askorbové a reduktonů

Princip:

Ve víně se kromě oxidu siřičitého vyskytují i jiné látky s redukčními schopnostmi, oxidovatelné roztokem jódu. Jedná se zejména o tzv. reduktony, případně kyselinu askorbovou, jejíž omezený přídavek je do vín povolen.

Pomůcky:

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

Chemikálie a roztoky:

1 % roztok acetaldehydu, 3 % roztok sodné soli kyseliny etylendiaminotetraoctové, 0,02 mol roztok jódu, 16 % roztok H₂SO₄, 0,5 % škrobový maz.

Postup:

Pipetujeme 50 ml testovaného vína do 250 ml kónické baňky se zábrusem. Přidáme 5 ml 1 % roztoku acetaldehydu, obsah krátce promícháme a uzavřeme zátkou. Po 30 minutách přidáme 10 ml 16 % roztoku H₂SO₄, 1 ml 3 % roztoku kyseliny etylendiaminotetraoctové a titrujeme 0,02 mol roztokem jódu na škrobový maz do modrofialového zbarvení, které vydrží 15 sekund.

Vyhodnocení:

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

x = koncentrace kyseliny askorbové a reduktonů v mg/l na celá čísla

a = spotřeba 0,02 mol roztoku jódu v ml

f = faktor 0,02 mol roztoku jódu

4.4 Senzorické hodnocení

Pro konzumenty je senzorický vjem nejpodstatnější vlastností vína. Pro ohodnocení vína je používán některý z bodových standardů. Nejčastěji jsou to bodové systémy penalizační, pětibodový, dvacetibodový či stobodový. Každý z bodovacích systémů má

za cíl kvalitativní seřazení vzorků a bodovým hodnocením vyjádřit jejich vzájemné rozdíly v kvalitě. Pro přesnější popis daného vína se používá několik rozšiřujících systémů. Může jít zejména o slovní hodnocení, a nebo další způsoby rozšíření popisu vína (aromatické profily).

Senzorické hodnocení bylo prováděno osmičlennou odbornou komisí. Po udělení pokynů komisím následovalo hodnocení nultého vzorku. Po bodovém sjednocení nultého vzorku následovalo hodnocení jednotlivých vzorků. Vždy po ohodnocení všech degustátorů následovalo nalití dalšího vzorku. Pro bodové hodnocení byl použit stobodový systém doplněný o základní upřesňující hodnocení jako odrůdovost, ovocnost, svežest, redukční tóny a polyfenoly. Každé z těchto hodnocení bylo obodováno na stupnici jedna až deset.

5 VÝSLEDKY

5.1 Naměřená data

Po analytickém měření byli všechny hodnoty zaneseny do následujících tabulek. Pro lepší orientaci byli různá stádia odběru a varianty značeny ve zkratkách:

Odběry (stav):

- RMUT - stádium rmutu
- LIS - stádium po vylisování
- DOKVAS - stádium dokvášejičního moštu
- VIN - stádium hotového vína

Varianty (dávka):

- SO₂ - kontrola; přídavek SO₂
- SAA - var.1; přídavek střední dávky kyseliny askorbové
- SO₂SAA - var.2; přídavek oxidu siřičitého a střední dávky kyseliny askorbové
- VAA - var.3; přídavek vysoké dávky kyseliny askorbové

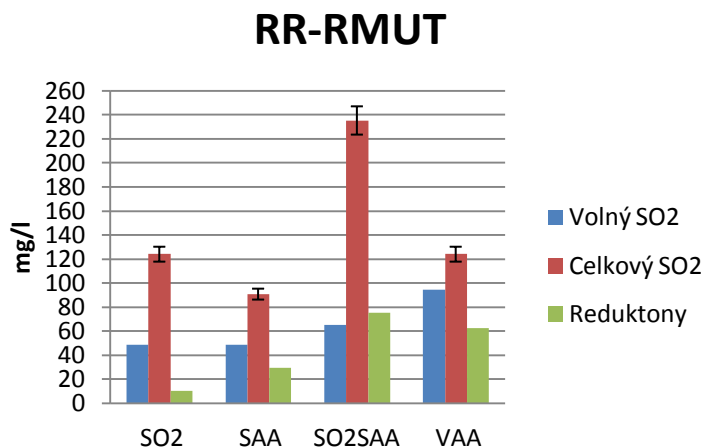
Tab.4: Naměřené hodnoty odrůdy Ryzlink rýnský

Stav	Dávka	Volný SO ₂	Celkový SO ₂	Reduktony
RMUT	SO ₂	48,598	124,058	10,232
RMUT	SAA	48,6	90,816	29,41
RMUT	SO ₂ SAA	65,142	235,33	75,46
RMUT	VAA	94,646	124,063	62,671
LIS	SO ₂	2,554	23,014	5,116
LIS	SAA	3,837	14,065	6,395
LIS	SO ₂ SAA	3,835	24,295	6,695
LIS	VAA	3,833	21,743	3,837
DOKVAS	SO ₂	1,279	8,944	5,116
DOKVAS	SAA	1,325	8,863	3,837
DOKVAS	SO ₂ SAA	0,148	14,069	6,395
DOKVAS	VAA	1,279	5,062	2,558
VIN	SO ₂	1,28	56,24	14,06
VIN	SAA	7,674	58,834	5,116
VIN	SO ₂ SAA	16,619	115,089	11,511
VIN	VAA	10,225	72,895	6,395

Tab.5: Naměřené hodnoty u odrůdy Veltlínské zelené

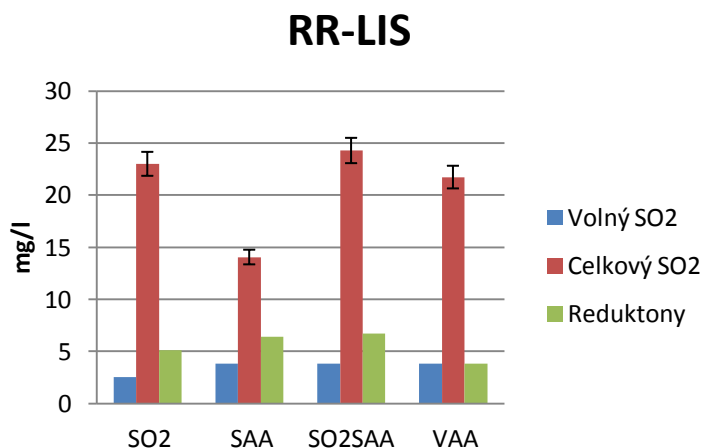
Stav	Davka	Volný SO ₂	Celkový SO ₂	Reduktony
RMUT	SO2	14,816	38,26	12,33
RMUT	SAA	8,637	43,185	11,105
RMUT	SO2SAA	67,86	107,28	44,42
RMUT	VAA	12,532	22,041	39,485
LIS	SO2	3,693	22,211	8,637
LIS	SAA	1,22	24,67	7,41
LIS	SO2SAA	2,473	34,555	4,93
LIS	VAA	0	16,31	7,53
DOKVAS	SO2	2,46	20,97	7,41
DOKVAS	SAA	0	8,79	9,71
DOKVAS	SO2SAA	0,015	18,49	7,41
DOKVAS	VAA	0	14,26	7,41
VIN	SO2	17,273	66,623	8,637
VIN	SAA	11,1	54,29	7,41
VIN	SO2SAA	14,8	98,06	7,41
VIN	VAA	19,75	40,21	6,616

5.2 Výsledky analytického rozboru



Graf 1: RR - naměřené hodnoty ve rmutu

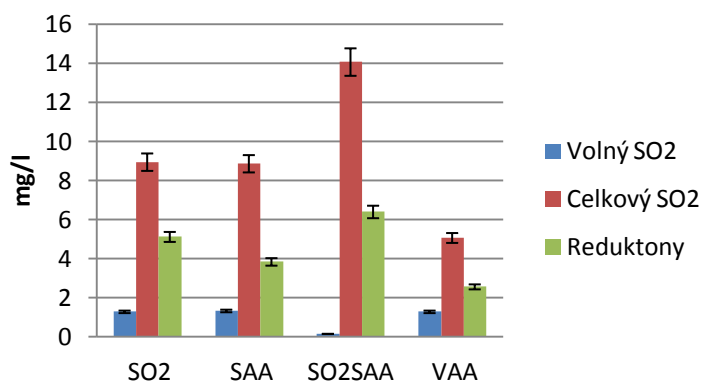
Graf zobrazuje jednotlivé hodnoty různých variant u stádia RMUT. Nejlepší ochranu proti oxidaci zabezpečuje varianta SO₂SAA, kde je největší hodnota reduktonů. U stádia RMUT je zobrazeno vyšší než přidané množství volného SO₂. To je pravděpodobně způsobeno špatnou homogenizací účinných látek.



Graf 2: RR - naměřené hodnoty po vylisování

Graf ukazuje hodnoty jednotlivých variant ve stádiu LIS. Je zobrazen výrazný pokles všech hodnot. Hodnota reduktonů se pohybuje v rozmezí od 4 do 7 mg/l. Další důležitá hodnota a to volný SO₂ je v rozmezí 2-4 mg/l.

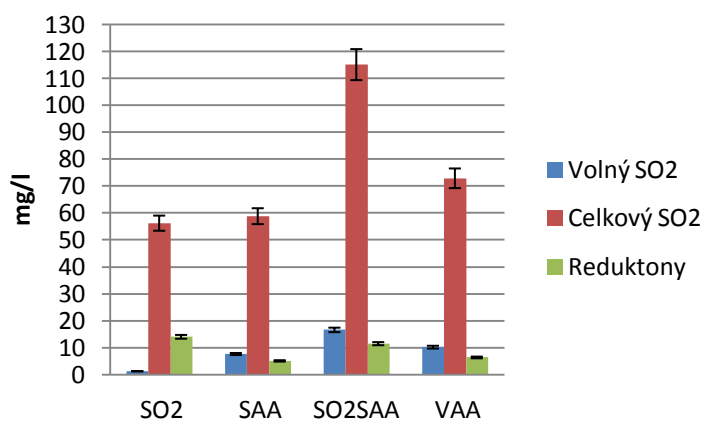
RR-DOKVAS



Graf 3: RR - naměřené hodnoty v dokvážejícím moštu

Další graf zobrazuje hodnoty jednotlivých variant ve stádiu DOKVAS. Jedná se o dokvážející mošt. Hodnoty volného oxidu siřičitého jsou zanedbatelné. Hodnota reduktonů je na stejné úrovni jako v předcházející variantě.

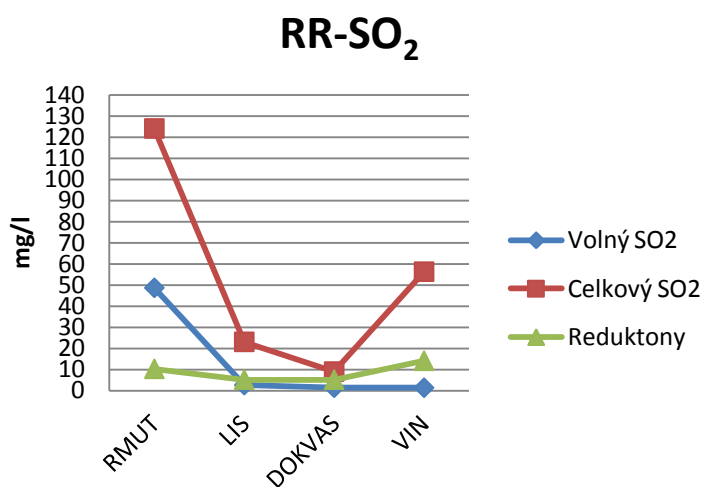
RR-VIN



Graf 4: RR - naměřené hodnoty v hotovém víně

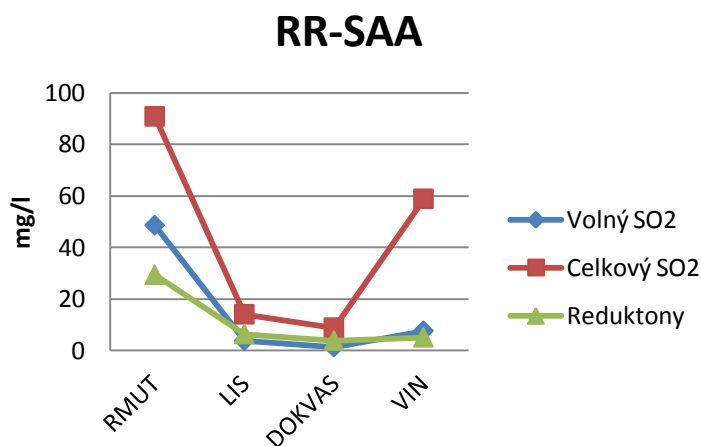
Tento graf zobrazuje naměřené hodnoty ve stádiu VIN neboli stádium hotového vína. Došlo zde k přidavku SO₂. Proto byli naměřeny vyšší hodnoty volného oxidu siřičitého a reduktonů a samozřejmě celkové SO₂, která s ostatními hodnotami úzce souvisí.

U všech předchozích grafů byla zvolená 5 % odchylka kvůli nízké četnosti měření.



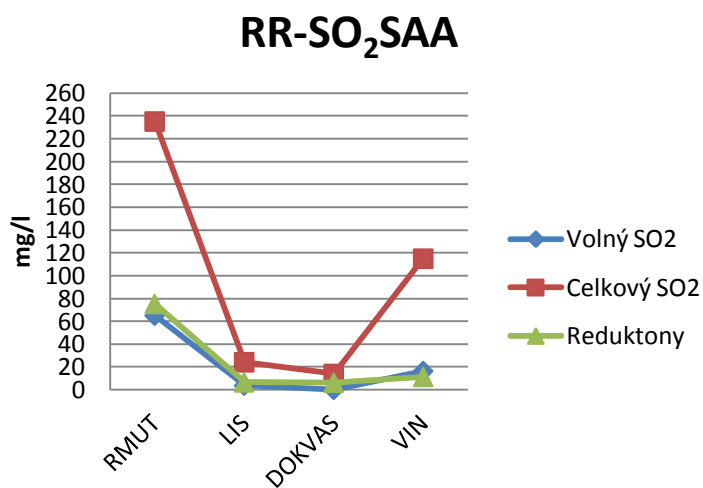
Graf 5: RR - varianta SO₂ (kontrola)

Tento graf ukazuje časovou křivku jednotlivých stádií vinifikace u všech variant pokusu. Vyobrazen je výrazný pokles volného SO₂ a reduktonů ze stádia RMUT do stádia LIS.



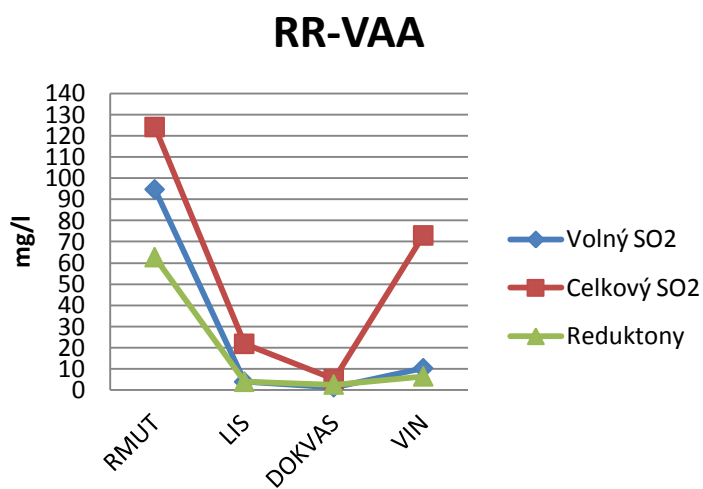
Graf 6: RR - varianta SAA (var.1)

Graf znázorňuje časovou křivku vinifikace. Jasně patrný je úbytek volného oxidu siřičitého a reduktonů.



Graf 7: RR - varianta SO₂SAA (var.2)

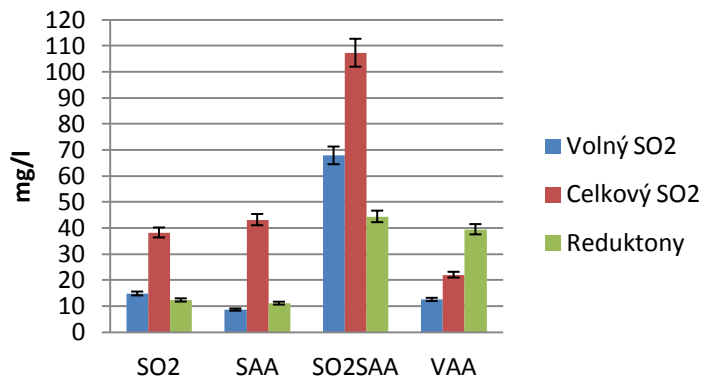
Graf zobrazuje časovou posloupnost jednotlivých stádií vinifikace u varianty SO₂SAA. I zde je výrazný pokles SO₂ a reduktonů po dvanáctihodinové maceraci mezi stádiem RMUT a LIS.



Graf 8: RR - varianta VAA (var.3)

Graf zobrazuje časovou křivku vinifikace u varianty s nejvyšší dávkou kyseliny askorbové (VAA). Stejně jako u předchozích variant došlo k rychlému poklesu hodnot při maceraci.

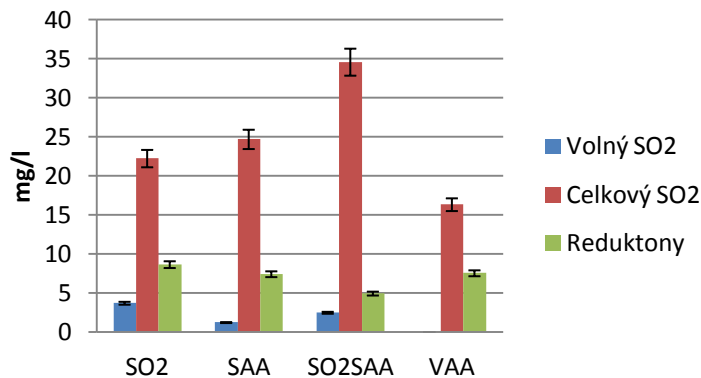
VZ-RMUT



Graf 9: VZ - naměřené hodnoty ve rmutu

Graf ukazuje naměřené hodnoty ve stádiu RMUT. Nejvíce volného oxidu siřičitého a reduktonů je obsaženo ve variantě SO₂SAA. Můžeme tedy předpokládat nejlepší protekci proti oxidaci.

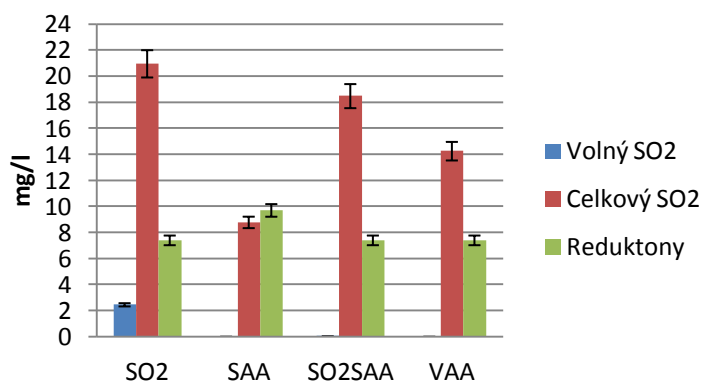
VZ-LIS



Graf 10: VZ - naměřené hodnoty po vylisování

Graf výše znázorňuje hodnoty jednotlivých variant ve stádiu LIS (po vylisování). Hodnota volného SO₂ a reduktonů je výrazně nižší. Konkrétně SO₂ 1-4 mg/l a reduktony 5-8 mg/l.

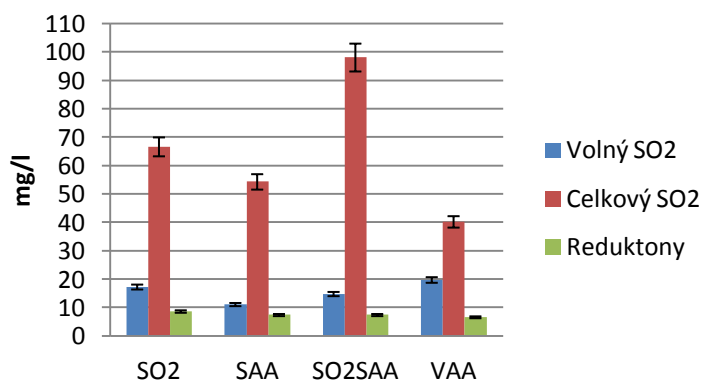
VZ-DOKVAS



Graf 11: VZ - naměřené hodnoty v dokvášejícím moštu

Graf zobrazuje jednotlivé varianty a výsledné hodnoty u stadia DOKVAS (dokvášející mošt). Jsou znázorněny vyšší hodnoty reduktonů než v předcházejícím grafu a to konkrétně 8-10 mg/l. Minimální množství volného oxidu siřičitého je způsobeno dokončující fermentací.

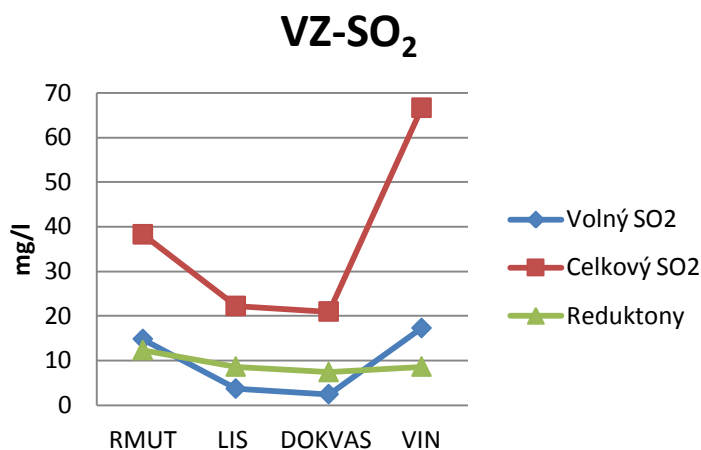
VZ-VIN



Graf 12: VZ - naměřené hodnoty v hotovém víně

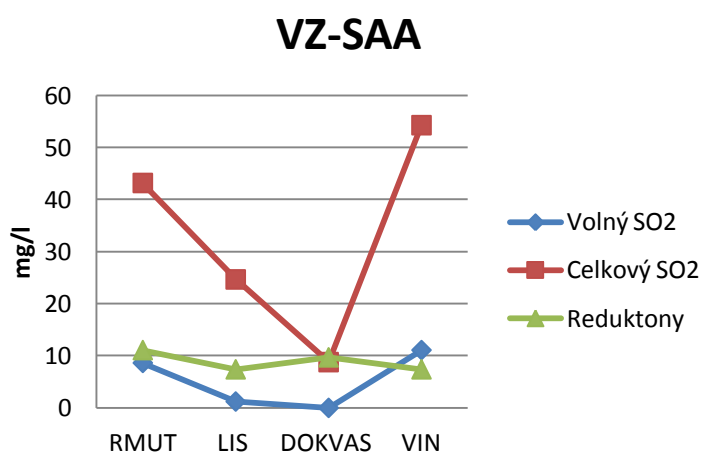
Graf ukazuje změřené hodnoty všech variant ve stádiu hotového vína (VIN). Vyšší hodnoty jsou dány přidavkem SO₂ do hotového vína.

Na každé výsledné hodnoty je nastavená 5 % odchylka, která byla zvolena kvůli nízké četnosti měření.



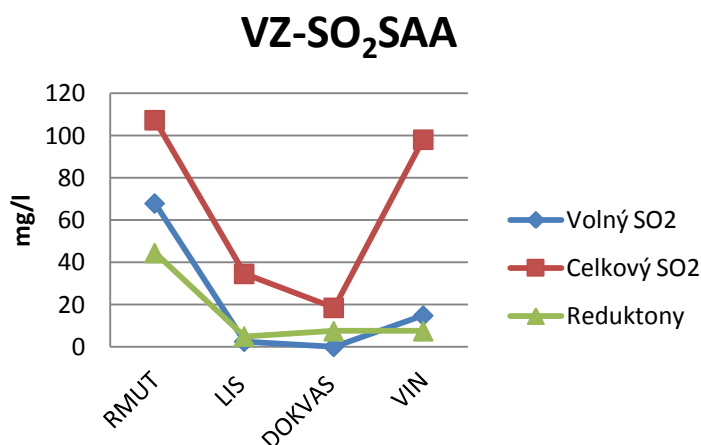
Graf 13: VZ - varianta SO₂ (kontrola)

Graf zobrazuje časovou křivku během celé výroby vína u kontrolní varianty. Hodnota reduktonů se u této varianty pohybuje v rozmezí 8-10 mg/l.



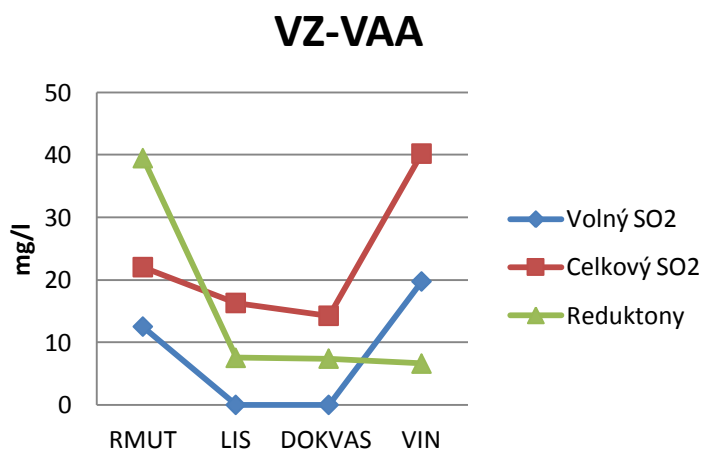
Graf 14: VZ - varianta SAA (var.1)

Graf vyobrazuje časovou posloupnost celé vinifikace a výsledné hodnoty u varianty se střední dávkou kyseliny askorbové (SAA). Hodnota volného oxidu siřičitého je minimální. Hodnota reduktonů je nejvyšší v dokvášejícím moštu 9 mg/l.



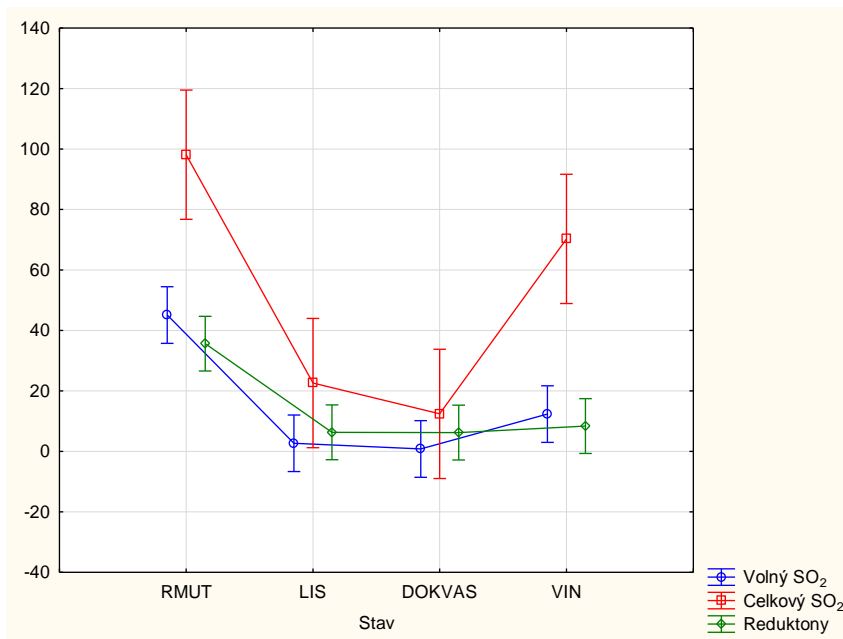
Graf 15: VZ - varianta SO₂SAA (var.2)

Graf výše zobrazuje časovou křivku jednotlivých stádií vinifikace u varianty SO₂SAA. Je vidět výrazný pokles volného SO₂ a reduktonů ze stádia RMUT do stádia LIS.



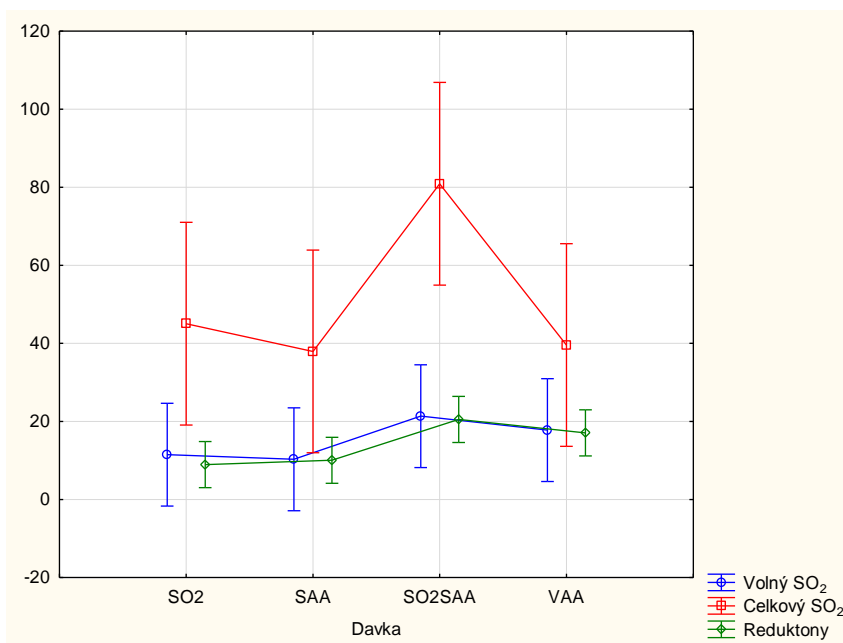
Graf 16: VZ - varianta VAA (var.3)

Graf ukazuje průběh vinifikace a naměřené hodnoty u varianty s nejvyšší dávkou kyseliny askorbové(VAA). Opět můžeme vidět pokles volného oxidu siřičitého a reduktonů ze stádia RMUT do stádia LIS. Výrazně vyšší hodnota u stádia VIN je způsobena přidáním volného SO₂ do hotového vína.



Graf 17: Celkové hodnocení jednotlivých stádií

Výše uvedený graf vyhodnocuje data všech variant a odrůd v uskutečněném pokusu. Ukazuje výrazné změny převážně ze stádia RMUT do stádia LIS.



Graf 18: Celkové hodnocení jednotlivých variant

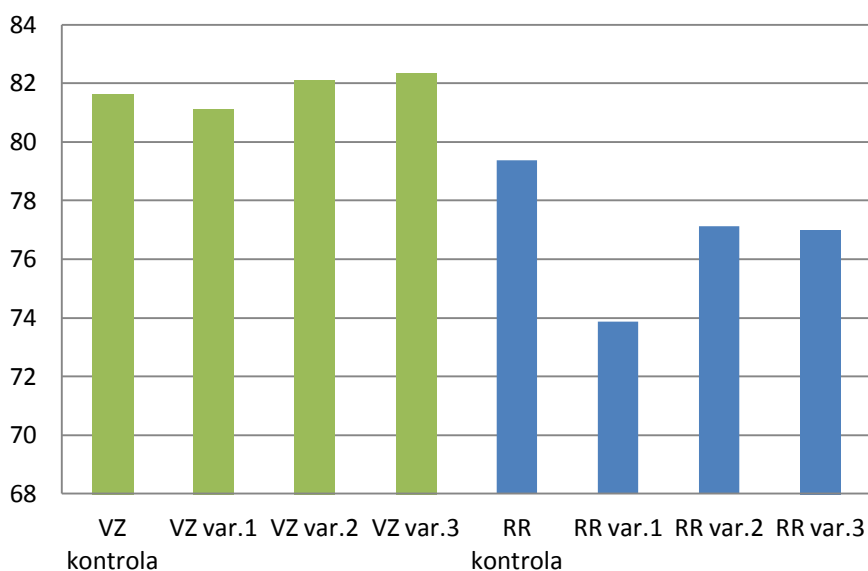
Celkový graf ukazuje nejlepší variantu pro ochranu produktu před oxidačními procesy. Nejlépe v průměru vychází varianta SO₂SAA,

5.3 Výsledky senzoričké analýzy

Tab.6: Výsledné body senzoričkého hodnocení a jejich průměr

VZ kontrola	VZ var.1	VZ var.2	VZ var.3	RR kontrola	RR var.1	RR var.2	RR var.3
83	84	84	86	79	75	81	79
85	86	88	86	80	77	83	78
75	74	79	78	86	72	67	76
81	84	84	86	78	77	82	77
83	84	82	84	79	77	80	78
81	76	80	82	79	72	77	77
84	76	76	75	73	69	69	69
81	85	84	82	81	72	78	82
81,625	81,125	82,125	82,375	79,375	73,875	77,125	77

Senzoričké hodnocení

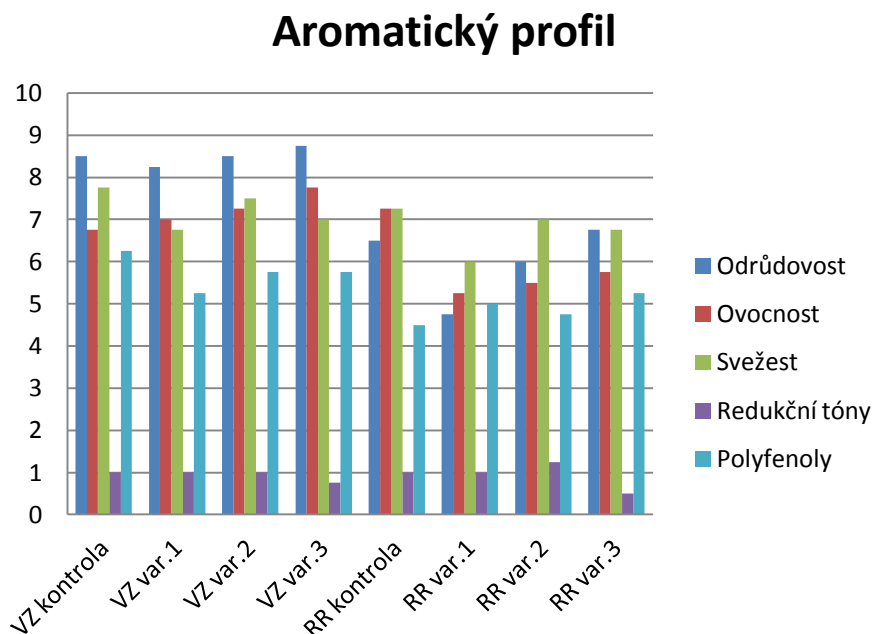


Graf 17: Výsledky senzoričkého hodnocení vín

Tento graf zobrazuje senzoričké hodnocení vzorků vín a všech jejich variant. Jak již bylo zmíněno, pro hodnocení vzorků byla použita stobodová stupnice.

U Ryzlinku rýnského dosáhla nejvíce bodů kontrola (SO₂), a to 79,375 bodů, u které došlo jen k přidavku SO₂.

U Veltlínského zeleného dosáhla nejlepšího bodového výsledku varianta 3 (VAA), a to 82,375 bodů. Tedy varianta s nejvyšší možnou dávkou kyseliny askorbové bez přídavku SO₂.



Graf 18: Výsledky hodnocení aromatického profilu vín

Výše vyobrazený graf ukazuje hodnocení aromatického profilu jednotlivých odrůd a variant. Bodování je zobrazeno na stupnici od 1 do 10.

6 DISKUZE

Kyselina askorbová je v dnešní době už plně rozšířenou látkou při výrobě především bílých vín. Nejdůležitější vlastností je okamžitý antioxidační účinek. Velká citlivost kyseliny askorbové na oxidaci ji však zajišťuje praktickou účinnost jen, pokud je omezen nebo zamezen kontakt se vzduchem. Její použití při technologii výroby vína může být přínosem jak sensorickým (zvýšení svežesti, ovocitosti), tak technologickým (lepší ochrana před oxidací). Naopak pokud není kyselina askorbová použita správně, může dojít v tvorbě nežádoucího peroxidu vodíku, který může způsobit nezvratné oxidace některých složek vína.

U odrůdy Ryzlink rýnský je jasně patrný vliv ročníku 2014. Konkrétně tato odrůda byla silně napadená houbovými chorobami, zvláště houbovou chorobou *Botrytis cinerea*. Proto můžeme předpokládat zvýšené množství oxidačních enzymů tyrosináza a lakáza. Michlovský (2012) tvrdí, že přidavek kyseliny askorbové umožňuje zcela zamezit nebo omezit oxidaci moštů katalyzovaných tyrosinázou nebo lakázou. Hodnoty volného oxidu siřičitého a reduktonů se však po dvanáctihodinové maceraci pohybovaly v rozmezí 4-6 mg/l. Tyto hodnoty jsou nedostatečné pro ochranu moštů před nežádoucí oxidací. Nejvíce chráněný byl mošt ihned po homogenizaci účinných látek, kde ještě nedošlo k jejich zoxidování. U grafů s časovou křivkou můžeme vidět vyšší naměřené hodnoty volného SO₂ než činila aplikovaná dávka. Tento fakt je způsoben nedostatečnou homogenizací účinných látek ve rmutu všech mikrovzorků.

Celkově největší antioxidační potenciál má kombinovaná varianta (SO₂SAA), kde byla použita dávka oxidu siřičitého a střední dávka kyseliny askorbové. Kombinovaná dávka oxidu siřičitého a kyseliny askorbové dokázala u Ryzlinku rýnského nejeftektivněji ochránit produkt před oxidací.

Ročník 2014 neměl na zdravotní stav hroznů Veltlínského zeleného takový vliv jako u předchozí varianty. Stejně tak však došlo k rychlému zoxidování SO₂ a reduktonů z moštu. Ve stádiu po maceraci bylo také naměřeno, že hodnoty volného oxidu siřičitého a reduktonů se pohybují v rozmezí 2-8 mg/l. Tato hodnota není dostačující pro správnou protekci moštu před oxidací. Zajímavé hodnoty byli zaznamenány u stádia dokvá-

šejícího moštu. Hodnota redukcí byla u všech variant vyšší než u stádia po vylisování moštu a pohybují se v rozmezí od 7-10 mg/l.

U odrůdy Veltlínské zelené není zcela jasné, která varianta je ideální z hlediska protekce produktu před oxidačními procesy. Jako nejlepší řešení se jeví varianty SO₂ a SO₂SAA. Varianta SO₂ ukazuje lepší antioxidační hodnoty u dokvášejícího moštu a hotového vína. Naopak varianta SO₂SAA ukazuje lepší hodnoty před samotnou fermentací. U obou variant byl do rmutu homogenizován oxid siřičitý. U druhé varianty byl doplněn střední dávkou kyseliny askorbové.

Dalším zajímavým faktorem je sledování sensorických parametrů sledovaných vín. Je zcela zřejmé, že sensoricky nejlepší vzorky nejsou stejné jako vzorky s největší ochranou proti oxidaci. U Ryzlinku rýnského nejlépe dopadla varianta pouze s přidavkem oxidu siřičitého (SO₂) a u Veltlínského zeleného je nejlépe hodnocenou volbou varianta s nejvyšší povolenou dávkou kyseliny askorbové (VAA). Michlovský (2012) uvádí, že přídavek kyseliny askorbové má vliv na odrůdu Veltlínské zelené zvýšením aroma exotického ovoce a ovocitosti. Výsledky však dokázaly, že nejlepší ohodnocení odrůdovosti je právě u variant s nejvyšší dávkou kyseliny askorbové (VAA) a nejvyšší míra svěžesti a ovocitosti je u kontrolních variant (SO₂) jak u Ryzlinku rýnského, tak Veltlínského zeleného. Vyšší hodnocení přítomnosti polyfenolů je pravděpodobně způsobeno problematickým ročníkem 2014, protože se vyskytuje u všech hodnocených variant.

Výsledky jsou značně ovlivněny problematickým rokem 2014. Na druhou stranu pokus jasně ukázal, že zvolené dávky účinných látek jsou v takovém problematickém ročníku nedostatečné. U silně napadených hroznů je dávka SO₂ do rmutu na 30 mg/l volného oxidu siřičitého nedostačující. Proto je nutné v těchto ročnících dávku SO₂ navýšit, aby došlo k efektivní ochraně rmutu a moštu. Ochrana pomocí kyseliny askorbové se jevila neúčinnější právě spolu s oxidem siřičitým. Bez použití oxidu siřičitého i za minimálního přístupu vzduchu došlo k nízké ochraně produktu před nežádoucími oxidačními procesy.

7 ZÁVĚR

Uskutečněný pokus v roce 2014 poukázal na fakt, že kyselina askorbová je látka efektivně působící jako antioxidant v technologii výroby vín. Samotný přídavek kyseliny askorbové nám plně nezajistí její účinnost. Naopak může kvalitu vína přímo ohrozit. Je nutné tuto látku dále vhodně suplementovat nejrozšířenějším antioxidantem, kterým je oxid siřičitý. Jen tímto způsobem se dá zajistit správný mechanismus protekce vín, moštů nebo rmutu proti oxidačním procesům.

Jak je známo oxid siřičitý je jedním z alergenů a může způsobovat zdravotní komplikace. Proto nejčastějším tématem výzkumu v oblasti technologie výroby vína je právě snižování dávek oxidu siřičitého. Společnou kombinací kyseliny askorbové a SO_2 je možné docílit nižších dávek oxidu siřičitého a zajistit tak víno zdravotně méně závadné. Důležité však je najít míru mezi zdravotní nezávadností a technologickou čistotou vyrobeného produktu.

8 SOUHRN

Tato diplomová práce byla zaměřená na vliv kyseliny askorbové na senzoričké a analytické parametry bílých vín během technologie výroby. Teoretická část se věnuje podrobnému popisu mechanismů oxidace kyseliny askorbové a konečným produktům degradace kyseliny askorbové. V teoretické části jsou také uváděny základní metody stanovení kyseliny askorbové. Další část je zaměřena na synergii kyseliny askorbové a, jedné z nejdůležitějších látek při výrobě vína, oxidu siřičitého.

Praktická část obsahuje pokus založený v roce 2014. Studie porovnává různé dávky kyseliny askorbové a oxidu siřičitého, které byly přidány do rmutu dvou odrůd Ryzlink rýnský a Veltlínské zelené. Pokus sleduje antioxidační schopnost kyseliny askorbové a její vliv na analytickou a senzoričskou složku výsledných vín.

Na základě získaných výsledků můžeme konstatovat, že kyselina askorbová má požadující antioxidační schopnosti pokud je vhodně suplementována právě oxidem siřičitým.

Klíčová slova: kyselina askorbová, oxid siřičitý, oxidace, rmut, mošt, víno

9 SUMMARY

This thesis was focused on the effect of ascorbic acid on sensory and analytical parameters of white wine during production technology. The theoretical part is devoted to a detailed description of the mechanisms of oxidation of ascorbic acid and ultimate degradation products of ascorbic acid. In the theoretical part are also given basic methods for the determination of ascorbic acid. Another part focuses on the synergy of ascorbic acid and one of the most important substances in the manufacture of wine, sulfur dioxide.

The practical part includes an attempt was founded in 2014. The study compared different doses of ascorbic acid and sulfur dioxide have been added to the mash two varieties, Riesling and Grüner Veltliner. Attempt monitors antioxidant properties of ascorbic acid and its influence on the analytical and sensory component of the resulting wines.

Based on the results, we can conclude that ascorbic acid has antioxidant capabilities asking if it was properly supplemented with sulfur dioxide.

Key words: ascorbic acid, sulfur dioxide, oxidation, mash, must, wine

10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Adams, J. B. (1997). Food additive interactions involving sulphur dioxide and ascorbic and nitrous acids: a review. *Food Chem.* **59**: 401–409.
2. Barril, C., Clark, A. C., and Scollary, G. R. (2008). Understanding the contribution of ascorbic acid to the pigment development in model white wine systems using liquid chromatography with diode array and mass spectrometry detection techniques. *Anal. Chim. Acta.* **621**: 44–51
3. Bauernfeind, J. C. and Pinkert, D. M. (1970). Food processing with added ascorbic acid. In: *Advances in Food Research*, pp. 219–315. Chichester, C. O., Mrak, E. M., and Stewart, G. F. Eds., Academic Press, London.
4. Balík J., *Vinařské návody do laboratorních cvičení*, 3 nezměněné vyd. Brno: Mendelova Univerzita v Brně, 2006. 96 s. ISBN 80-7157-933-5
5. Boulton, B. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., and Kunkee, R. E. (1996). *Principles and Practices of Winemaking*. Springer, New York, p. 408.
6. Bradshaw, M. P., Prenzler, P. D., and Scollary, G. R. (2002). Square-wave voltammetric determination of hydrogen peroxide generated from the oxidation of ascorbic acid in a model wine base. *Electroanal.* **14**: 546–550.
7. Bradshaw, M. P., Scollary, G. R., and Prenzler, P. D. (2004). Examination of the sulfur dioxide-ascorbic acid anti-oxidant system in a model white wine matrix. *J. Sci. Food Agric.* **84**: 318–324.
8. Buettner, G. R. (1986). Ascorbate autoxidation in the presence of iron and copper chelates. *Free Radical Res. Com.* **1**: 349–353.
9. Buettner, G. R. and Jurkiewicz, B. A. (1996b). Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. In: *Handbook of Antioxidants*, pp. 91–115. Cadenas, E., Packer, L. Eds., Marcel Dekker, New York.
10. Clark, A. C., Pedretti, F., Prenzler, P. D., and Scollary, G. R. (2008). Impact of ascorbic acid on the oxidative coloration and associated reactions of a model wine solution containing (+)-catechin, caffeic acid and iron. *Aust. J. Grape and Wine Res.* **14**: 238–249.
11. Cooper, A. J. L., Ginos, J. Z., and Meister, A. (1983). Synthesis and properties of the alpha-keto acids. *Chem. Rev.* **83**: 321–358.

12. Danilewicz, J. C. (2003). Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper. *Am. J. Enol. Vitic.* **54**: 73–85.
13. Danilewicz, J. C. (2007). Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper. *Am. J. Enol. Vitic.* **58**: 53–60.
14. Danilewicz, J. C., Seccombe, J. T., and Whelan, J. (2008). Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **59**: 128–136.
15. Deutsch, J. C. (1997). Ascorbic acid and dehydroascorbic acid interconversion without net oxidation or reduction. *Anal. Biochem.* **247**: 58–62.
16. Es-Safi, N., Cheynier, V., and Moutounet, M. (2003). Effect of copper on oxidation of (+)-catechin in a model solution system. *Int. J. Food Sci. Tech.* **38**: 153–163.
17. Finholt, P., Paulssen, R. B., Alsos, I., and Higuchi, T. (1965). Rate studies on the anaerobic degradation of ascorbic acid II. Rate of formation of carbon dioxide. *J. Pharm. Sci.* **54**: 124–128.
18. Finholt, P., Paulssen, R. B., Alsos, I., and Higuchi, T. (1965). Rate studies on the anaerobic degradation of ascorbic acid II. Rate of formation of carbon dioxide. *J. Pharm. Sci.* **54**: 124–128.
19. Goshima, K., Maezono, N., and Tokuyama, K. (1973). A novel degradation pathway of L-ascorbic acid under non-oxidative conditions. *Bull. Chem. Soc. Japan.* **46**: 902–904.
20. Guzman Barron, E. S., DeMeio, R. H., and Klemperer, F. (1936). V. Copper and hemochromogens as catalysts for the oxidation of ascorbic acid. The mechanism of the oxidation. *J. Bio. Chem.* **113**: 625–640.
21. Isaacs, N. S. and van Eldik, R. (1997). A mechanistic study of the reduction of quinones by ascorbic acid. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2**: 1465–1467.
22. Kimoto, E., Tanaka, H., Ohmoto, T., and Choami, M. (1993). Analysis of

- the transformation products of dehydro-L-ascorbic acid by ion-pairing high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **214**: 38–44.
23. Kurata, T. and Fujimaki, M. (1976a). Formation of 3-Keto-4-deoxypentosone and 3-Hydroxy-2-pyrone by the degradation of dehydro-L-ascorbic acid. *Agr. Biol. Chem.* **40**: 1287–1291.
 24. Kurata, T. and Sakurai, Y. (1967a). Degradation of L-ascorbic acid and mechanism of nonenzymic browning reaction Part III. Oxidative degradation of L-ascorbic acid (degradation of dehydro-L-ascorbic acid). *Agr. Biol. Chem.* **31**: 177–184.
 25. Loschner, J., Kroh, L., and Vogel, J. (1990). Ascorbic acid- a carbonyl component of non-enzymatic browning reactions. *Zeitschrift fur Lebensmitteluntersuchung und - Forschung A.* **191**: 302–305.
 26. MICHLOVSKÝ, M. 2012: *Oxid sířičitý v enologii*. 1. vyd. Vinselekt Michlovský, a.s. pp.151, ISBN 978-80-905319-0-1.
 27. Niemela, K. (1987). Oxidative and non-oxidative alkali-catalysed degradation of L-ascorbic acid. *J. Chrom.* **399**: 235–243.
 28. Peng, Z., Duncan, B., Pocock, K. F., and Sefton, M. A. (1998). The effect of ascorbic acid on oxidative browning of white wines and model wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* **4**: 127–135.
 29. Peng, Z., Duncan, B., Pocock, K. F., and Sefton, M. A. (1999). The influence of ascorbic acid on oxidation of white wines: diminishing the long-term antibrowning effect of SO₂. *Aust. Grapegrower Winemaker.* **426a**: 67–73.
 30. Rankine, B. (2002). *Making Good Wine*. Pan Macmillan Australia, Sydney, pp. 87–117.
 31. Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D. (2000). *Handbook of Enology: The Chemistry of Stabilization and Treatments*. JohnWiley and Sons, New York pp. 198–201.
 32. Sawamura, M., Takemoto, K., Matsuzaki, Y., Ukeda, H., and Kusunose, H. (1994). Identification of two degradation products from aqueous dehydroascorbic acid. *J. Agric. Food Chem.* **42**: 1200–1203.

33. Shtamm, E.V., Purmal, A. P., and Skurlatov, Y. I. (1979). Mechanism of catalytic ascorbic acid oxidation system Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 . *Int. J. Chem. Kinetics* **XI**: 461–494.
34. Silverblatt, E., Robinson, A. L., and King, C. G. (1943). The kinetics of the reaction between ascorbic acid and oxygen in the presence of copper ions. *J. Am. Chem. Soc.* **65**: 137–141.
35. Singleton, V. L. (1987). Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: observations and practical implications. *Am. J. Enol. Vitic.* **38**: 69–77.
36. Skouroumounis, G. K., Kwiatkowski, M. J., Francis, I. L., Oakey, H., Capone, D. L., Peng, Z., Duncan, B., Sefton, M. A., and Waters, E. J. (2005). Influence of ascorbic acid on the composition, color and flavor properties of a Riesling and a wooded Chardonnay wine over five years storage. *Aust. J. Grape and Wine Res.* **11**: 355–368.
37. Taqui Khan, M. M. and Martell, A. E. (1967a). Metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid by molecular oxygen. I. Cupric and ferric ion catalyzed oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* **89**: 4176–4185.
38. Taqui Khan, M. M. and Martell, A. E. (1967b). Metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid by molecular oxygen. II. Cupric and ferric chelate oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* **89**: 7104–7111.
39. Velíšek, J., Davídek, J., Kubelka, V., Zelinková, Z., and Pokorný, J. (1976).
40. Volatile degradation products of L-dehydroascorbic acid. *Z. Lebensm.* **162**: 285–290.
41. Wedzicha, B. L. (1984). *Chemistry of Sulfur Dioxide in Foods*. Elsevier Applied Science, London, pp. 183–229.
42. Wedzicha, B. L. and Imeson, A. P. (1977). The yield of 3-deoxy-4-sulphopentosulose in the sulphite inhibited non-enzymic browning of ascorbic acid. *J. Sci. Fd Agric.* **28**: 669–672.
43. Wedzicha, B. L. and McWeeny, D. J. (1974). Non-enzymic browning reactions of ascorbic acid and their inhibition. The production of 3-deoxy-4-sulphopentosulose in mixtures of ascorbic acid, glycine and bisulphite ion. *J. Sci. Fd Agric.* **25**: 577–587.

44. Wurdig, G. and Woller, R. (1989). *Chemie des Weines*. Ulmer, Stuttgart. p. 358.
- Yen, G.-C., Duh, P.-D., and Tsai, H.-L. (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem.* **79**: 307–313.
45. Yuan, J.-P. and Chen, F. (1998). Degradation of ascorbic acid in aqueous solution. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 5078–5082.
46. Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., and Nury, F. S. (1995). *Wine Analysis and Production*. Chapman and Hall, New York. pp. 178–191.

11 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr.1: Vzorec kyseliny askorbové

Obr.2: A) Celková reakce; B) Navrhovaný mechanismus pro oxidaci fenolických sloučenin ve víně

Obr.3: Reakce kyseliny askorbové s molekulárním kyslíkem

Obr.4: Redukce ortho-chinonových sloučenin na kyselinou askorbovou

Obr.5: Oxidace kyseliny askorbové a některé produkty jejího rozkladu

Obr.6: Aerobní degradace kyseliny askorbové a tvorba 3-hydroxy-2-pyronu a 2-furoové kyseliny (Kimoto et al., 1993; Yuan and Chen, 1998).

Obr.7: Další produkty degradace kyseliny askorbové v aerobním prostředí

Obr.8: Anaerobní degradace kyseliny askorbové za vzniku furfuralu (Shinoda et al., 2004)

Obr.9: Oxidace kyseliny askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou

Obr.10: Schéma titrace kyseliny askorbové dichlorfenolindofenolem

Obr.11: Antioxidační role oxidu siřičitého ve víně

Obr.12: Reakce oxidu siřičitého s kyselinou dehydroaskorbovou

Obr.13: Aerobní reakce oxidu siřičitého a kyseliny askorbové

Obr.14: Produkt anaerobní degradace kyseliny askorbové v reakci s SO₂

12 SEZNAM TABULEK

Tab.1: Formální redukční potenciál na pH stupnici (3,5) kyseliny askorbové, molekulárního kyslíku a katecholu (Danilewicz, 2003)

Tab.2: Obsah kyseliny askorbové (mg/l) v průběhu anaerobní degradace ve vodném roztoku při různých teplotách (Anmo et al., 1971; Finholt et al., 1965; Niemela, 1987; Rodriguez et al., 1991)

Tab.3: Karbonylové sloučeniny a jejich disociační konstanta ve vazbě s oxidem siřičitým (Betterton and Hoffman, 1987)

Tab.4: Naměřené hodnoty odrůdy Ryzlink rýnský

Tab.5: Naměřené hodnoty u odrůdy Veltlínské zelené

Tab.6: Výsledné body sensorického hodnocení a jejich průměr

13 SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: RR - naměřené hodnoty ve rmutu

Graf 2: RR - naměřené hodnoty po vylisování

Graf 3: RR - naměřené hodnoty v dokvášejícím moštu

Graf 4: RR - naměřené hodnoty v hotovém víně

Graf 5: RR - varianta SO₂ (kontrola)

Graf 6: RR - varianta SAA (var.1)

Graf 7: RR - varianta SO₂SAA (var.2)

Graf 8: RR - varianta VAA (var.3)

Graf 9: VZ - naměřené hodnoty ve rmutu

Graf 10: VZ - naměřené hodnoty po vylisování

Graf 11: VZ - naměřené hodnoty v dokvášejícím moštu

Graf 12: VZ - naměřené hodnoty v hotovém víně

Graf 13: VZ - varianta SO₂ (kontrola)

Graf 14: VZ - varianta SAA (var.1)

Graf 15: VZ - varianta SO₂SAA (var.2)

Graf 16: VZ - varianta VAA (var.3)

Graf 17: Výsledky senzoričké hodnocení vín

Graf 18: Výsledky hodnocení aromatického profilu vín