

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

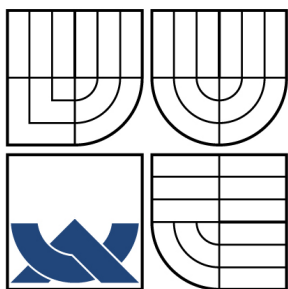
VLIV SPONTÁNNÍHO A ŘÍZENÉHO KVAŠENÍ NA OBSAH
ORGANICKÝCH KYSELIN
VE VÍNĚ

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

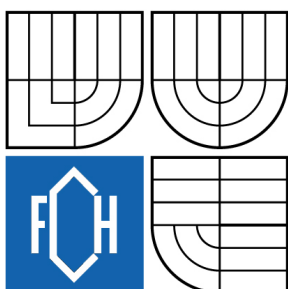
HANA KŘIŽÁNKOVÁ

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLIV SPONTÁNNÍHO A ŘÍZENÉHO KVAŠENÍ NA OBSAH ORGANICKÝCH KYSELIN VE VÍNĚ

INFLUENCE OF SPONTANEOUS AND INOCULATED FERMENTATION
ON THE ORGANIC ACID CONTENT IN WINE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

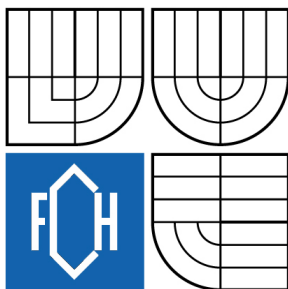
HANA KŘIŽÁNKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

PhDr. MIROSLAV HRSTKA, Ph.D.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce	FCH-DIP0164/2007	Akademický rok: 2008/2009
Ústav	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka)	Hana Křížánková	
Studijní program	Chemie a technologie potravin (MPCP_CHTP)	
Studijní obor	Potravinářská chemie a biotechnologie (MPCO_CHTP)	
Vedoucí diplomové práce	PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.	
Konzultanti diplomové práce		

Název diplomové práce:

Vliv spontánního a řízeného kvašení na obsah organických kyselin
ve víně

Zadání diplomové práce:

1. V teoretické části popsat výrobu vína spontánním a řízeným kvašením a shrnout názory různých autorů na vztah typu kvašení a obsah organických kyselin ve víně.
2. V experimentální části sledovat obsah organických kyselin v odrudovém víně v průběhu spontánního a řízeného kvašení.

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Hana Křížánková
student(ka)

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

doc. Ing. Jaromír Havlíka, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá sledováním vlivu řízeného a spontánního kvašení na obsah organických kyselin v odrůdovém víně (Rulandské modré) pocházejícího z velkopavlovické podoblasti. Výchozí podmínky analýzy, uváděné v článku [41] a v materiálech týkající se chromatografické kolony, byly v průběhu experimentu pozměněny tak, aby byla provedena co nejpřesnější analýza vzorku vína. Na začátku experimentu byl u obou kvašení přidán enzym Rapidase Excolor, a u řízeného kvašení ještě kvasinky.

Byly analyzovány čtyři organické kyseliny, a to kyselina vinná, jablečná, mléčná a citrónová. Stanovení koncentrace jednotlivých kyselin bylo provedeno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC s UV detekcí. Víno bylo zpracováno dvěma technologickými postupy - spontánním a řízeným kvašením. Mezi jednotlivými procesy kvašení byl patrný rozdíl v obsahu organických kyselin.

Při spontánním kvašení hodnota koncentrace kyseliny vinné kolísala v intervalu 1,63 g/l až 6,43 g/l. Tento pokles byl způsoben probíhajícími biologickými procesy. Proces spontánního kvašení téměř neovlivnil hodnotu koncentrace kyseliny citrónové. Vlivem probíhající malolaktické fermentace došlo ve víně k poklesu koncentrace kyseliny jablečné (z hodnoty 6 g/l na 1,87 g/l), a ke zvýšení koncentrace kyseliny mléčné (z hodnoty 0,55 g/l na 4,8 g/l).

Při řízeném kvašení dochází opět ke kolísání hodnoty koncentrace kyseliny vinné. K největšímu nárůstu koncentrace došlo ve 214. hodině experimentu, kdy byl proces kvašení podpořen přidávkem mléčných bakterií. Vlivem probíhající malolaktické fermentace dochází opět k poklesu koncentrace kyseliny jablečné a ke zvýšení koncentrace kyseliny mléčné. Během řízeného kvašení vykazovala koncentrace kyseliny citrónové opět konstantní hodnoty.

V tomto experimentu bylo prokázáno, že ve víně zpracovaném způsobem řízeného kvašení je vyšší obsah zjišťovaných organických kyselin než při procesech spontánního kvašení.

KLÍČOVÁ SLOVA

Organické kyseliny, víno

ABSTRACT

Diploma thesis deals with the problem of observation of controlled and spontaneous fermentation influence on the organic acids content in species of wine (Ruland blue) originated in subregion of Velké Pavlovice. Initial conditions of analysis (introduced in [41] and in materials concerning chromatographic column) were changed during lasting of experiment in such manner to get the most precise analysis of the wine sample. Enzyme Rapidase Excolor was added in the beginning of both types of fermentation plus yeasts were added at the controlled fermentation.

Analysis of four organic acids was done; these were tartaric, malic, lactic and citric acid. High performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection method was used to determine concentration of each acid. Wine was processed by two technological methods – by spontaneous and controlled fermentation. Each of the process differed in the organic acids content.

Concentration of tartaric acid varied from 1,63 g/l to 6,43 g/l during spontaneous fermentation process. Decrease was caused by biological processes taking place. Concentration of citric acid was not almost influenced by the process of fermentation. Due to malolactic fermentation being in progress, decrease in malic acid concentration (from 6 g/l to 1,87 g/l) and increase in lactic acid concentration was observed.

Concentration of tartaric acid varies as well during controlled fermentation. Biggest increase in concentration was observed at hour 214 of the experiment when the process of fermentation was supported by addition of lactic bacteria. Due to malolactic fermentation being in progress, decrease of malic acid concentration and increase of lactic acid concentration was observed similar to simultaneous fermentation. Concentration of citric acid was constant during controlled fermentation.

Experiment proved that there is higher content of observed organic acids during controlled fermentation than during processes of spontaneous fermentation.

KEYWORDS

Organic acids, wine

KŘÍŽÁNKOVÁ, H. *Vliv spontánního a řízeného kvašení na obsah organických kyselin ve víně*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 57 s. Vedoucí diplomové práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis diplomanta

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat paní RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Víno	9
2.1.1	Historie vinohradnictví a vinařství na našem území	9
2.1.2	Víno a zdraví	10
2.1.3	Biologický původ	10
2.1.4	Složení hroznů	11
2.1.5	Zrání hroznů	12
2.1.6	Technologie výroby bílých vín	14
2.1.6.1	Mletí, drcení a odzrnění hroznů	15
2.1.6.2	Macerace	15
2.1.6.3	Odkalení moštu	15
2.1.6.4	Úprava cukernatosti a obsahu kyselin	16
2.1.6.5	Kvašení moštů	16
	Spontánní kvašení	16
	Řízené kvašení	17
2.1.6.6	Školení a zrání vína	18
2.1.7	Výroba červeného vína	18
2.1.7.1	Způsob zpracování hroznů na výrobu červených vín	19
2.1.7.2	Úprava rmutu	19
2.1.7.3	Nakvácení rmutu	19
2.1.7.4	Lisování červeného rmutu	20
2.1.7.5	Speciální postupy kvašení	20
2.1.8	Vinařské oblasti – podoblast velkopavlovická	21
2.1.9	Vybraná odrůda	23
2.2	Organické kyseliny ve víně	24
2.3	Metody stanovení organických kyselin ve víně	27
2.3.1	Spektrofotometrické metody	27
2.3.2	Enzymatické metody	27
2.3.3	Chromatografické metody	27
2.3.3.1	Chromatografie tenké vrstvy (TLC)	27
2.3.3.2	Plynová chromatografie (GC)	27
2.3.3.3	Kapalinová chromatografie	28
	Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC)	28
	Iontová chromatografie	29
2.3.3.4	Elektroforézní metody	29
2.4	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	31
2.4.1	Princip HPLC	31
2.4.2	Instrumentace HPLC	32
2.4.2.1	Čerpadla	32
2.4.2.2	Dávkování vzorků	32
2.4.2.3	Chromatografické kolony	33
2.4.2.4	Detektory	33

3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
3.1	Přístroje a zařízení	35
3.1.1	Kapalinový chromatograf Waters 2487	35
3.1.2	Chromatografická kolona ZORBAX SB-Aq	35
3.1.3	Dávkovač vzorku.....	36
3.1.4	Analytické váhy.....	36
3.2	Chemikálie a vzorky.....	36
3.2.1	Vzorky.....	36
3.2.2	Chemikálie	36
3.3	Příprava roztoku mobilní fáze	36
3.4	Příprava standardu a vzorků	37
3.4.1	Příprava standardu.....	37
3.4.2	Příprava vzorků	37
3.5	Vlastní měření.....	37
3.6	Vyhodnocení výsledků	37
4	VÝSLEDKY.....	38
4.1	Chromatogramy	38
4.2	Srovnání obsahu organických kyselin u odrůdy Ruladské modré	46
4.2.1	Tabulky.....	46
4.2.2	Časové závislosti	48
5	DISKUSE	51
6	ZÁVĚR.....	53
7	LITERATURA	54
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	57

1 ÚVOD

Po staletí, možná i tisíciletí přispívalo víno ke kvalitě života mnohým společenstvím světa, a tak je tomu dodnes.

Metody výroby vína se liší nejen od kraje ke kraji, ale také od oblasti k oblasti a od pěstitele k pěstiteli v téže obci. Záleží mnoho i na tom, zda se dodržují tradiční principy výroby nebo se zavádějí inovace a zda je pro ně dostupná technologie. Jakkoli se vinař rozhodne, určité základní principy zůstávají pořád stejné.

Již dříve lidé dovedli z hroznů získávat mošt pomocí šlapání ve velkých kádích, tak dlouho dokud všechen mošt nevytekl. Postupem času lidé vyvinuli kládové či šroubové lisy. V dnešní době se používají moderní hydraulické stroje, které dokážou vyždímat surovinu doslova na troud.

Po získání moštu začíná proces transformace na víno. Jde o složitý přírodní proces, v němž má člověk úlohu dozoru, aby se celá proměna nezvrhla nežádoucím směrem. Přírodě je jedno, jestli konečným produktem kvašení bude vinný ocet nebo špičkové víno. A právě v moderních provozech je úloha člověka zvýrazněna oproti dřívějším tradičním výrobám, kde to celé probíhalo jaksi samovolně dle přírody a vinař se mnohdy nestačil divit, co že se mu to v sudu narodilo. V dnešních provozech umějí lidé kvašení vhodně regulovat tak, aby výsledek tohoto procesu byl co nejlepší. Nejdůležitější v celé přeměně jsou kvasinky. Do moštu se kvasinky dostávají z hroznů nebo půdy a jen zhruba polovina je ušlechtilých, ostatní jsou divoké.

V moderních provozech se vinaři snaží již při zpracování hroznů a ošetření moštu omezit přítomnost divokých kvasinek přidáním sušených ušlechtilých kvasinek, které přesně odpovídají dané odrůdě či typu vína. Důležitou součástí kvasných procesů jsou i fyzikální činitele jako je teplota a tlak. Ponechat mošt jeho osudu a radovat se, jak je sud teplý a mošt kvasí bouřlivě, patří už pomalu do vinařské historie. Moderní metody řízeného kvašení udržují teplotu prokvašení moštu kolem 20 °C, při které dochází k nejlepšímu průběhu celého děje. V moderních technologiích se ještě provádí řízené jablečno-mléčné kvašení, které v optimálních podmínkách probíhá ve víně samovolně. Protože není možné řídit jeho průběh, může dojít k procesům, které poškozují chuť vína.

Ve víně je také určité procento organických kyselin měnících se v průběhu stárnutí vína. Jejich obsah záleží na ročníku, ale také na odrůdě. Kyseliny se do vína dostávají buď přímo z hroznů (kyselina vinná, jablečná, citrónová atd.), nebo vznikají jako vedlejší produkt kvasného procesu při přeměně cukrů na alkohol. Jde o výsledek alkoholového a jablečno-mléčného kvašení (kyselina mléčná, octová, glykolová atd.). Přítomnost kyselin ovlivňuje především chuťovou vyrovnanost vína. Obsah kyselin ve víně se obecně pohybuje v rozmezí 4 – 9 g/l. Delší vyzrávání není umožněno vínu s nedostatkem kyselin, víno s nízkým obsahem kyselin je ploché a fádňí. Naopak nadbytek a nevyváženost kyselin kazí chuť vína.

Předkládaná diplomová práce sleduje obsah organických kyselin v odrůdovém víně Rulandské modré zpracovávaném spontánním a řízeným kvašením.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Víno

2.1.1 Historie vinohradnictví a vinařství na našem území

Hrozny a účinky jejich zkvašené šťávy jsou známy člověku od počátku jeho existence. Vinařství kolem roku 3500 před naším letopočtem bylo na vysoké úrovni ve staré Mezopotámii a především v Egyptě. Egypťané již zcela zvládali technologii výroby vína a pěstovali šest až osm odrůd vinné révy, nejvíce poblíž dnešního města Alexandrie. Důkazy vyspělého vinařství nacházíme v antickém Řecku, na Krétě a v Thrákii (dnešní Bulharsko). Z těchto oblastí se vinařství rozšířilo do Itálie, na Sicílii a do Španělska. Fénicičané, osídlvatelé oblastí kolem Středomoří, zakládali rozsáhlé vinice v severní Africe. Poté rozšiřovali svoji působnost do jižní části Francie, kde předávali znalosti místním Galům, nám známým Keltům. Keltové jsou první skupinou na našem území, kteří zde víno konzumovali a možná i pěstovali, přestože počátky našeho vinohradnictví jsou spojovány s Římany.

Na našem území došlo ke značnému rozšíření vinic v období Velkomoravské říše, tedy během 9. a 10. století našeho letopočtu. Významnou roli v šíření vinařství v raném středověku u nás hrály klášterní komodity. V klášteře na Břevnově se vyrábělo víno od roku 933. První zmínka o vinicích na Moravě je z roku 1101. Rozvoj vinohradnictví podpořili na Moravě v roce 1202 cisterciáci z klášteře ve Velehradě u Uherského Hradiště a ve Skoršicích u Hustopečí. Během celého 13. století se zásluhou klášterů zakládaly souvislé celky vinic. Obliba vína rostla a vinná réva se začala objevovat kolem měst a to hlavně Brna, Znojma, Mikulova a později v Hustopečích. Již na přelomu 13. a 14. století naši předkové byli nuceni bránit domácí trh před zahraniční konkurencí. Proto si roku 1325 vyžádali ustanovení, že se smějí od sklizně do Velikonoc v Brně šenkovat pouze domácí vína. V roce 1355 moravský markrabě Jan Jindřich vydal vzorový viniční řád pro Moravu a v Brně vydal nařízení o povinném zápisu vinic do berních knih. Rozkvět vinařství nastal v průběhu 14. století za vlády císaře Karla IV., který dal přivést do Čech révu z Burgundska a Porýní. Karel roku 1358 dal vinohradnictví právní rámec ve formě královského mandátu a vydal právo viničné – bulu o zakládání vinic. V průběhu celého 14. století je zřejmý nárůst ploch vinic na Moravě, což byla především zásluha měšťanů. Na počátku 15. století v období husitských válek došlo ke zničení mnoha vinic. O zlepšení v druhé polovině 15. století se postaral Jiří z Poděbrad a jeho nástupce Vladislav II. Jagelonský, za jehož vlády vinařství dosáhlo svého vrcholu. V roce 1497 vydává Vladislav II. Jagelonský nařízení o povinném zapsání všech vinic do gruntovních knih. Za vlády Rudolfa II. dochází k úpadku našeho vinařství, proto roku 1590 vydal „Instrukci o vinařství“, která řeší tehdejší problémy. Hlavní úpadek městského vinařství nastal v období třicetileté války, kdy bylo mnoho vinic zničeno a opuštěno. Válečné události v 17. a 18. století zanechaly značné stopy i na českých a moravských vinicích. V průběhu 19. století přispěl k úpadku také rozvoj pivovarnictví a stoupající dovoz zahraničních vín. Snaha o povznesení českého a moravského vinařství vedla k zakládání škol pro vyškolení odborníků v oblasti pěstování vinné révy a výrobě vína. Skutečná katastrofa pro vinařství přišla po roce 1860, kdy k nám byl z Ameriky zavlečen škůdce révokaz, houbové choroby podium a peronospora. Tyto pohromy zničily většinu vinic, nakonec bylo potřeba obnovovat vinice štěpováním, a proto byly zřízeny státní révové školy. Opětovné

poznesení vinařství a obnovu vinic utlumila první světová válka roku 1914–1918 a později i druhá světová válka. Od konce šedesátých let až do roku 1984 se postupně zvětšovaly plochy vinic až na 15 000 ha, na kterých hospodařila jednotná zemědělská družstva. Úroveň našeho vinařství v 80. letech zaznamenala velkou uniformitu – co největší sklizeň, na úkor kvality vyráběných vín. Dlouhodobé hospodaření, ve kterém se více dbalo na zisk a kvantitu vína než na kvalitu, bylo zvráceno v listopadu 1989. Již v roce 1990 vznikla aktivní potřeba zákona, který by navazoval na přerušenu tradici z dob Rakouska-Uherska.

Důležitým krokem ke zkvalitnění vinné révy i výroby vína v České republice bylo v roce 1995 přijetí zákona č.115/1995 Sb. o vinohradnictví a vinařství a zejména jeho pozdější novelizace č. 216/2000 Sb. Tento zákon dává předpoklady pro zvyšování úrovně vinařství, jeho kvality a produkci vín u nás.[1]

2.1.2 Víno a zdraví

Vínu byly už ve starém Řecku a Římě prisuzovány léčivé i posilující účinky. Bylo doporučeno lidem starým, zesláblým nemocí či stíženým chmurami, ale také zdravým jako prevence.[2]

Bílé víno pomáhá na horečku, při průjmu sklenku před a po jídle, při chřipce půl lahve svařeného vína po čtyřech dávkách za den. Červené víno pomáhá na dnu nebo stárnutí.[3]

Byť by bylo víno sebestopšnější, samo o sobě nic nedokáže se zdravím člověka, který se přecpává tučným masem, kouří a takřka se nehýbe. Takový člověk je náchylný na onemocnění ischemickou chorobou srdeční a některých zhoubných nemocí. Na vzniku těchto nemocí se podílí volné radikály, což je skupina chemických látek napadajících stěny buněk. Jejich působení může vést také ke kornatění tepen, infarktům nebo mozkovým příhodám. Zdravé tělo bojuje proti volným radikálům enzymy, které redukuje nebezpečné chemické látky. Pokud enzymy nestačí, je potřeba antioxidantů. Existují jich stovky, řadu z nich najdeme ve vitamínu C, E a beta karotenu. Jako další možnost „boje“ proti volným radikálům byl objeven účinek skupiny flavonoidů, kterých je ve víně celá řada. Do této skupiny chemických látek se řadí např. katechin, epikatechin, quercetin, kaemforol a řadu flavevandiolů. Při pití vína se dostávají do krve, kde působí právě jako antioxidanty. Snižují tak tvorbu okysličeného lipoproteinu, který působí při kornatění tepen.[3]

Mějme ale na paměti, že i víno je alkohol, proto se musí pít v rozumné míře, aby léčil a neškodil.

2.1.3 Biologický původ

Ušlechtilá réva evropská – *Vitis vinifera* je nejstarším a jediným evropským druhem révy vinné. K nám se dostala ze Středomoří, kde má tradici několik tisíc let. Je příbuzná s révou *Vitis sylvestris* rostoucí divoce v západní Asii a byla známa i v celé jižní a střední Evropě. Réva *Vitis vinifera* je geneticky velmi plastická, a proto existují stovky jejích odrůd, vzniklých mutací nebo cílevědomým šlechtěním, adaptovaných na nejrůznější půdní i klimatické podmínky.

Je to teplomilná rostlina, které se daří tam, kde neklesají teploty pod -20 °C, průměrné letní teploty jsou 18 – 25 °C a jarní 12 °C. Horní mez jejího pěstování je na severní polokouli na 20° až 50° s.š. a na jižní polokouli 30° až 50° j.š.

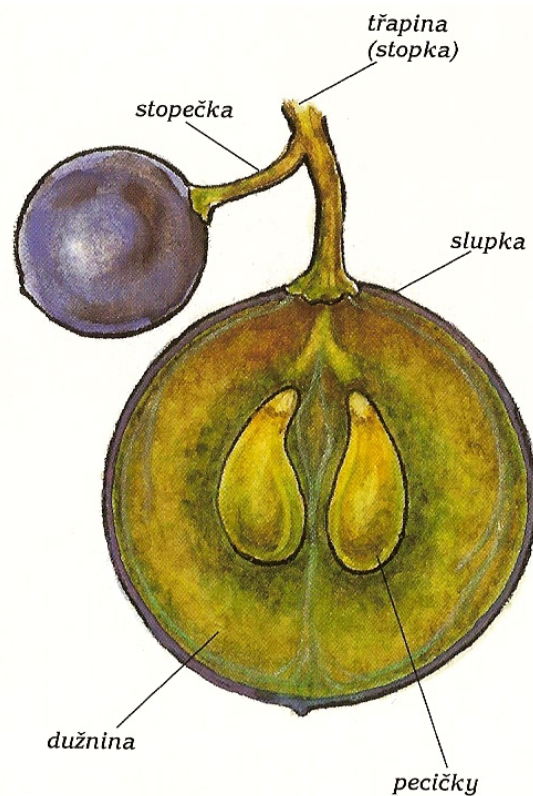
Optimální podmínky pro dokonalé vyvrání hroznů hlavně u modrých odrůd jsou v oblastech, kde se nevyskytují jarní mrazy a kde je dostatek slunečního záření během roku. Velmi důležitý z tohoto hlediska je i dlouhý a teplý podzim, který pro úplné dozrání hroznů vytváří optimální podmínky.

Réva americká se vyskytuje v Severní Americe a má několik druhů (např. *Vitis riparia*, *Vitis berlandieri*, *Vitis rupestris*). Je velmi plodná, odolná vůči chorobám a proti poškození kořenů révokazem. Proto se užívá u nás jako podnož, na kterou se roubují řízky révy *Vitis vinifera*. [4]

2.1.4 Složení hroznu

Aby bylo produkováno víno vysoké kvality, musí být při zpracování zohledněno rozdělení jednotlivých látek v hroznu.

Hrozny se skládají z bobulí a třapin. Bobule mají na povrchu voskovou vrstvu, pod ní je slupka s tříslovinami a barvivy, dužnina a pečičky neboli semena. Třapina je stopka s hlavními a vedlejšími osami. [6]



Obr. 1 Složení hroznu. Převzato z [12]

Tenká vosková vrstva (kutikula) potahuje celou bobuli a chrání jí před mechanickým poškozením a nadměrným vypařováním. Tato vrstva ovlivňuje ulpívání prostředků ochrany rostlin a pohlcování pachů z okolí (např. asphalt, nafta, močůvka).

Slupka bobule sestává z 10 – 12 vrstev relativně malých buněk (tloušťky asi 7 – 15 μm), které jsou odpovědné za mechanickou pevnost a ochranu. Jejich tloušťka stěny 1 – 6 μm je tedy relativně velká. Každá buňka navazuje na sousedních 14 buněk a je složena z elementárních vláken (mikrofibril) celulózy pro dosažení pevnosti v tahu a základní hmoty z hemicelulózy, proteinů a pektinových látek dodávajících pružnost. Slupka a semena obsahují většinové množství fenolických látek (třísloviny, barviva), minerálních látek (vápník, draslík), pektinů, proteinů a hroznových enzymů.

Velké buňky dužniny mají velmi slabé, málo stabilní stěny. V nich se nachází největší množství šťávy, kterou lze lehce získat. Jejimi hlavními složkami jsou cukry glukóza a fruktóza a kyseliny vinná a jablečná.

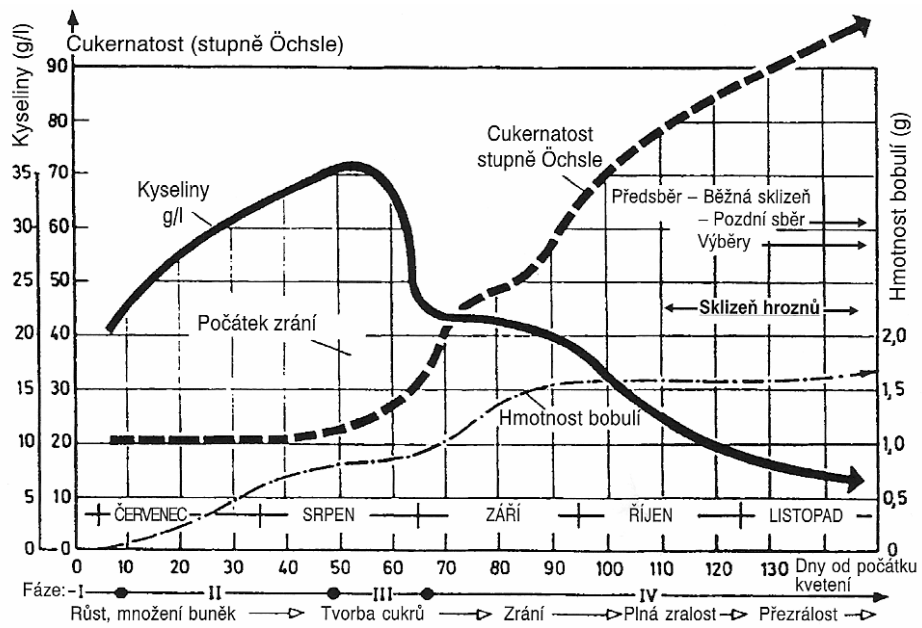
Pecičky a třapiny obsahují velké množství tříslovin a mohou vínu dodat nepříjemně hořkou a škrablavou chuť. Proto je třeba omezit jejich poškození a vyluhování.[6]

2.1.5 Zrání hroznů

Zrání hroznů je charakteristické měknutím bobulí, které se stávají průsvitnými. V období zrání přechází cukr z listů do bobulí, kde se ukládá a částečně se spotřebovává dýcháním při zrání hroznů. Na začátku je obsah cukru velmi vysoký, ale postupným dozríváním se obsah cukru zmenšuje. Zrání hroznů je charakteristické i změnou barvy – zelená se mění na zelenožlutou a při červených odrůdách na červenou až modročervenou. Při zrání nastává jednak vznik volných i vázaných kyselin v bobulích, jako i jejich odbourávání vlivem dýchání. Při dýchání a oxidaci se víc kyselin rozloží, než se jich vytvoří, následkem čehož se obsah kyselin v průběhu zrání v bobulích sníží (obr. 2). Při zrání hroznů současně s přílivem glukózy a fruktózy se hromadí v bobulích barvivo, jehož obsah při přezrívání hroznů klesá. Vznikají i aromatické látky, které jsou uloženy převážně ve slupce. Aromatické látky hroznů jsou prchavé látky podobné éterickým olejům, které jsou směsí aromatických a alifatických alkoholů, esterů, aldehydů, kyselin a heterocyklických sloučenin. Jejich chemické složení není ještě známé. Jednotlivé odrůdy hroznů se vyznačují aromatem, které je pro odrůdu charakteristické.[7]

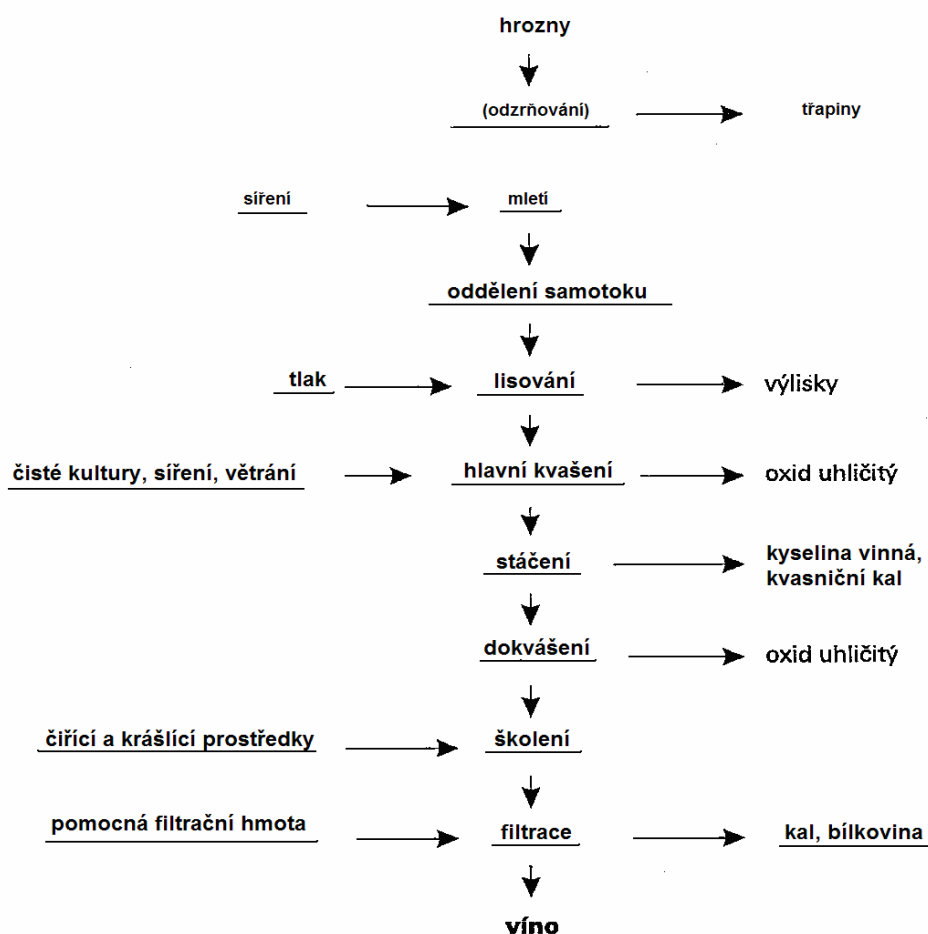
Rozlišují se následující stadia vyzrálosti:

- buketní zralost: úplné hroznové aroma, obsah cukru ještě není maximální
- plná zralost: je dosaženo maximálního obsahu cukru, získatelného asimilací, hrozny obsahují veškeré živiny a barviva, pecičky jsou vyzrálé, bobule jsou měkké
- přezrálost: slupka bobule je prodyšná, voda se může odpařovat, ostatní složky se zahušťují, částečně odbourávají
- nedostatečná vyzrálost: může být způsobena suchem a přetížením keřů [6]



Obr. 2 Průběh růstu a zrání bobulí. Převzato z [6]

2.1.6 Technologie výroby bílých vín



Obr. 3 Schéma znázornění zpracování hroznů na víno. Převzato z [6]

Mezi sklizní hroznů a začátkem alkoholového kvašení proběhnou v průměru dva dny. V tomto období se musí uskutečnit řada opatření, které ovlivňují kvalitu vína po léta nebo desetiletí. Způsob zpracování hroznů a moštu do značné míry ovlivňuje kvalitu výsledného produktu. Z toho vyplývá odpovědnost získat z hroznů správným rozhodnutím co nejlepší víno. V minulém desetiletí došlo k výrazné mechanizaci zpracování hroznů, což nahradilo těžkou fyzickou práci, zvýšilo výkonnost, ale snížilo kvalitu vína a rychlé stárnutí v důsledku zvýšení kalů a hořčin. V současnosti je patrná snaha o získání moštu s nízkým podílem kalů šetrným a rychlým zpracováním hroznů. Tím je dán základ pro kvalitní víno.[10] Podíl výroby bílých vín je v České republice vyšší než červených, což vyplývá především z lepší vyzrállosti hroznů u bílých odrůd.

Bílá vína vznikají téměř výhradně kvašením moštu odděleného od pevných částí bobulí. Za podmínek řízení teploty je však rovněž možné nechat proběhnout krátkodobou macerací hroznů.[7]

2.1.6.1 Mletí, drcení a odzrnění hroznů

Při výrobě bílých vín je nezbytné zbavit hrozny třapin, které mohou způsobovat negativní chuťové tóny, pachuti po třapinách ve víně.

Hrozny je možné úplně rozemlít nebo aspoň trochu rozdrtit. Tím dojde pouze k částečnému rozrušení bobulí, což má velmi pozitivní vliv na kvalitu vína. U bílých odrůd se ve vinařství používá rovněž technologie lisování celých hroznů. Tímto způsobem získáváme svěží, aromatická vína s jemnou kyselinkou. Je však třeba zohledňovat skutečnost, že takto vyrobená vína mají nižší obsah fenolických látek, jež přispívají ke stabilitě vína. Tato vína jsou vhodná ke konzumaci v prvním roce po výrobě, kdy si dosud zachovávají svoji svěžest.[7]

2.1.6.2 Macerace

Použití macerace závisí na odrůdě révy a typu vína, který chceme vyrobit, na stupni vyzrálости hroznů a na jejich zdravotním stavu. Bílé hrozny s horším stupněm vyzrálости bobulí ve špatném zdravotním stavu (plísňe a hniloby) nejsou pro maceraci vhodné. Cílem macerace je většinou dosažení lepší extrakce aromatických látek vázaných ve slupkách a těsně pod nimi.

Za určitý způsob macerace lze považovat i pomalé lisování hroznů. Při pomalém lisování se v lisu nacházejí rozdrčené bobule, které již mohou uvolňovat aromatické látky. Delší a pomalé lisování má pozitivní vliv při teplotách 10 – 15 °C. Při vyšších teplotách dochází k rozvoji mikroflóry, a tím ke snížení kvality hroznů a vína. Pro kvalitní maceraci jsou zapotřebí studené hrozny zbavené třapin, listů a úlomků letorostů, které by mohly negativně ovlivnit chuťový projev vína. Délka macerace se pohybuje kolem 12 – 20 hodin. Pro úspěšnou maceraci je důležitá řízená teplota a nepřítomnost kyslíku. Tyto podmínky zaručují optimální extrakci aromatických látek a téměř minimální extrakci trpkých nebo hořkých fenolických látek. Macerace může také vést ke snížení obsahu kyselin a zvýšení hodnoty pH. Pro maceraci je třeba hrozny vylisovat, mošt odkalit a připravit na zahájení alkoholového kvašení. Vína vyráběná macerací na slupkách mají většinou vyšší obsah aminokyselin, což ovlivňuje zejména rychlý nástup kvašení a plynulé prokvašení. Nachází se v nich vyšší obsah polysacharidů a bílkovin, proto jsou náročnější na stabilizaci proti bílkovinným zákalům, takže bývá nezbytné použití bentonitu při jejich čiření. Macerace se může provádět u mnoha odrůd: aromatické muškátové odrůdy (Muškát moravský, Ottonel, Irsai Oliver), aromatické odrůdy „tramínového typu“ (Tramín, Pálava), ostatní odrůdy (Ryzlink rýnský, Ryzlink vlašský, Sauvignon).[7]

2.1.6.3 Odkalení moštu

Vylisovaný mošt má vždy určitý zákal. Zůstávají v něm pevné částice, které pocházejí z bobulí – semena, zbytky slupek a dužiny, v některých případech rovněž části třapin. Velmi nežádoucí je, když nacházíme mezi kalovými částicemi i mikrobiální organismy (plísňe, bakterie, kvasinky) a rezidua přípravků na ochranu rostlin (v případě nedodržení ochranné lhůty po jejich aplikaci). Základním předpokladem pro výrobu kvalitního bílého vína, které bude mít vynikající aromatickou a chuťovou kvalitu, je dobře technologicky zvládnuté odkalení moštu. Je však třeba zmínit, že ani filtrovaný, absolutně čirý a čistý mošt není

zárukou výroby kvalitního bílého vína. Intenzita odkalení musí být přizpůsobena kvalitě a zdravotnímu stavu hroznů. O tvorbě kalových částic rozhoduje rovněž obsah polysacharidů v moštu. U hroznů napadených šedou hnilobou se při odkalení moštů vyskytují problémy a je třeba použít enzymy.

Neodkalené mošty s vysokým podílem kalových částic s sebou přinášejí:

- zvýšenou potřebu aplikace oxidu siřičitého;
- většinou rychlé a prudké kvašení, které je spojeno s výrazným zahříváním;
- z toho plynoucí požadavky na chlazení moštů;
- kvašení moštů při vyšších teplotách vede ke ztrátě aromatických látek a snižování obsahu alkoholu;
- v konečné fázi výroby vína zhoršení filtrovatelnosti vína;
- v neodkaleném moštu se vyskytuje větší množství mikroorganismů – plísní, bakterií a kvasinek, které mohou iniciovat choroby vína.

Ponechání určitého množství kalových částic, je pro výrobu vína u malovinařů důležité z několika důvodů:

- v kalových částicích se nacházejí látky, které slouží jako výživa pro kvasinky;
- při spontánním kvašení je jemný kal zdrojem kvasinkové mikroflóry;
- moderní typ vína s výrazným ovocným charakterem v chuti a vůni požaduje bezpodmínečně určitý stupeň odkalení;
- odkalení moštu zlepšuje fermentační aroma bílých vín.[7]

2.1.6.4 Úprava cukernatosti a obsahu kyselin

Po odkalení moštu a ještě před začátkem kvašení provedeme úpravu cukernatosti. Běžně se nestanovuje chemicky přímo cukr, ale relativní hustota moštu na základě hustoty. Hustotu stanovujeme pomocí moštoměru.[6,7]

U bílých moštů je možné obsah kyselin i částečně snížit. Mošty se odkyselují chemicky s použitím uhličitanu vápenatého. Aplikací uhličitanu vápenatého se odstraňuje z moštu pouze kyselina vinná. Zároveň je třeba si uvědomit další důležitou skutečnost, že odkyselováním snižujeme nejenom obsah kyselin, ale i obsah extraktu v budoucím víně.

Druhý způsob snížení kyselin v moštu je scelení moštu kyselého s méně kyselým. Zde si však musíme zase uvědomit, že pokud se jedná o odrůdové víno, musí být tato úprava provedena pouze v rámci jedné odrůdy.

Zvyšování obsahu kyselin je zakázáno.[7]

2.1.6.5 Kvašení moštů

Alkoholové kvašení moštů je základem technologie výroby vína. Jedná se o nejdůležitější biochemický proces při výrobě vína, který vyžaduje důslednou kontrolu jeho průběhu. Ve vinařské praxi rozlišujeme dva druhy kvašení moštů: spontánní a řízené.

Spontánní kvašení

Je to tradiční technologie kvašení moštů při výrobě vína. Vína vyrobená touto technologií vyžadují delší čas na výrobu, aby kvalitně uzrála. Zároveň se při něm vytváří komplexní spektrum aromatických látek. Velmi pozitivní je v těchto vínech vyšší hodnota bezcukerného

extraktu. Vzhledem k rozmanité mikroflóře je při spontánním kvašení nutná kontrola průběhu aplikace oxidu siřičitého. Ta je významná zejména z důvodu minimalizace populace bakterií. Je-li surovina zdravá, nemusí se oxid siřičitý aplikovat vůbec. Negativní stránkou aplikace oxidu siřičitého je totiž to, že dojde k oddálení nástupu spontánní činnosti kvasinek.

Praktické poznatky o průběhu spontánního kvašení:

- kvašení je určeno pouze pro dokonale vyztřelé hrozny s vynikajícím stavem,
- na hroznech je možný výskyt ušlechtilé šedé hniloby,
- nejvhodnější je sklizeň hroznů při nižších teplotách,
- nutné je šetrné odstopkování, drcení, mletí,
- u aromatických odrůd je možné aplikovat krátkou dobu maceraci,
- následuje šetrné lisování při nižších tlacích,
- aplikace oxidu siřičitého do moštu
- při odkalení je třeba odstranit pouze nejhrubší kal,
- teplota moštu by měla být 15 °C,
- po úpravě cukernatosti následuje spontánní kvašení,
- kontrola kvašení z hlediska výskytu možných chorob a vad,
- kvašení může být delší a trvat i měsíc, po úplném prokvašení stočíme víno z kalu,
- po stočení upravíme hladinu volného oxidu siřičitého.

Aromatický a chuťový vývoj takto vyrobených vín je delší než u vín vyrobených řízeným kvašením. Aromaticky jsou však velmi výrazná, odrůdově typická a chuťově plná, což způsobuje vyšší hodnota bezcukerného extraktu a vyšší obsah glycerolu.

Řízené kvašení

Pod tímto termínem se skrývá aplikace sušených vinných kvasinek do moštu a zároveň řízení teploty po celou dobu kvašení, protože teplota kvašení má velmi významný vliv na výslednou kvalitu vína. Každý výrobce vína má dnes velké možnosti při výběru sušených vinných kvasinek v prodejnách vinařských potřeb. Proto můžeme vybrat kvasinky podle následujících kritérií: kvasinky zvýrazňující charakter odrůd nebo kvasinky zvýrazňující aromatické projevy odrůd; kvasinky určené pro tzv. „primeur vína“, tzn. vína určená pro konzumaci v období do Vánoc; kvasinky pro plná extraktivní vína.

Optimální teploty pro alkoholové kvašení bílých moštů by neměly v žádném případě přesáhnout teplotu 25 °C, což je teplota kvasícího moštu. Při vyšších teplotách dochází k rychlému kvašení, vysokým ztrátám alkoholu a aromatických látek.[5] Vysoká teplota podporuje nástup jablečno-mléčného kvašení, které není vždy u bílých vín žádoucí. Může docházet k negativním změnám kvality vína vlivem bakterií, které vysoká teplota podporuje v činnosti. Při vyšší teplotě kvašení než 30 °C, může docházet k neprokvašení, víno má pak nižší obsah alkoholu a vysoký obsah zbytkového cukru.

Optimální technologie řízeného kvašení by měla být následující: teplota moštu před začátkem kvašení 15 – 18 °C, v průběhu kvašení v žádném případě by neměla překročit 25 °C, za těchto podmínek dojde k poměrně rychlému nástupu kvašení, dále následuje plynulé prokvašení bez obsahu zbytkového cukru, takové víno má vyšší obsah alkoholu a vyšší obsah glycerolu nežli produkty vyrobené při vyšších teplotách nad 25 °C. V dnešní době trh požaduje vína svěží a výrazně aromatická. Tento typ vín se vyrábí technologií chladného kvašení. Teplota moštu u této technologie se pohybuje v rozsahu 13 – 18 °C a kvašení probíhá déle. Takto vyrobené víno má vyšší obsah alkoholu.[7]

2.1.6.6 Školení a zrání vína

Až do doby ukončení kvašení je vhodné, aby výroba bílých vín probíhala v nerezových nádobách nebo ve skleněných demižonech. Bílá vína jsou vyráběna reduktivním způsobem, zabráníme tak výraznější oxidaci. Po ukončení kvašení musíme přistoupit ke stáčení mladého vína. Při něm dbáme, aby docházelo k minimálnímu kontaktu vína se vzduchem. Tím zabráníme poškození aromatického charakteru výsledného produktu. Provzdušnění vína je žádoucí, pouze pokud se snažíme odstranit například pachut' po kvasinkách nebo začínající výskyt sirky. V průběhu zrání vína se snažíme minimalizovat počet stáčení. Po prvním stočení vína nastává vhodný okamžik pro konečnou úpravu kyselin ve víně – odkyselení. Z hlediska kvality jde především o získání harmonické kyseliny, která nenarušuje chuť vína. Kyseliny ve víně mohou způsobovat trpkou chuť, podobně jako některé skupiny fenolů – taniny. Rovněž je třeba usilovat o harmonický poměr mezi obsahem zbytkového cukru a obsahem kyselin. U bílých vín často dochází i k přirozenému snížení obsahu kyselin. Obsah kyselin se snižuje v důsledku tvorby vinného kamene. K přirozené tvorbě vinného kamene může docházet již při maceraci hroznů, v průběhu kvašení i zrání vína. Chemické odkyselení je vhodné provádět s použitím uhličitanu vápenatého. Ke snížení kyselin může napomoci i vystavení vína chladu. V procesu školení a zrání vína provádíme následující operace: čiření, odstranění bílkovinných zákalů, filtrace, lahvování.[7]

2.1.7 Výroba červeného vína

Červené víno se značně liší od bílého, proto jeho výroba vyžaduje odlišné postupy. Červená vína se vyznačují svou sytější červenou barvou, přiměřenou trpkostí a příjemnou vůní a buketem. Hodnoty těchto složek jsou různé podle odrůdy hroznů. Důležitou úlohu při získání kvalitního vína hrají použité technologické postupy při výrobě. Při hodnocení kvality červených vín je velmi důležité kritérium sytosti a intenzity červené barvy. Barva červeného vína závisí v první řadě na obsahu barevných látek v hroznu, které se vytvářejí v průběhu růstu a zrání hroznu. Nedo zralé hrozny mají málo barvy a u přezralých hroznů se barvivo ztrácí. Důležitou úlohu při tvorbě barviva v hroznu má sluneční světlo. V oblastech, kde je málo slunečního svitu je hrozen méně vybarvený. Nejvíce barviva má hrozen v plné zralosti, proto je velmi důležité stanovit dobu sběru hroznů.

V evropských odrůdách ušlechtilých hroznů je barvivo uloženo ve slupkách. Intenzita barvy červeného vína závisí od celkového chemického složení moštu a budoucího vína a od teploty při kvašení, ale i od způsobu zpracování hroznů. Z hlediska chemického složení je důležitý zejména obsah cukru v moštu, a tedy i alkoholu v budoucím víně, a obsah kyselin. Pokud se předpokládá, že víno bude mít nízký obsah alkoholu, třeba ho zlepšit přidáním sacharózy, protože vína s vyšším obsahem alkoholu mají intenzivnější a sytější barvu a celkově má víno větší ohnivost. Pokud má mošt a mladé červené víno větší obsah kyselin, není to na škodu, protože obsah kyselin se v průběhu kvašení a zrání snižuje jablečno-mléčnou fermentací a vysrážením hydrogenvinanu draselného.[7]

2.1.7.1 Způsob zpracování hroznů na výrobu červených vín

K získání správného charakteru červených vín se používá víc různých způsobů na zpracování hroznů. Je to odzrňování hroznů, mlýnkování, nakvašení rmutu, macerace pod tlakem oxidu uhličitého, macerace teplem a jiné kombinace. Tyto metody se neustále zdokonalují a hledá se neoptimálnější způsob zpracování hroznů na červené víno, který by vyhovoval jak kvalitou, tak praktickým zpracováním.[7]

Odzrňování se provádí, protože třapiny hroznů nejsou v době sklizně vyschlé, jsou ještě živě zelené a obsahují listovou zeleň (chlorofyl). Chlorofyl je rozpustný v lihu, a proto by se při kvašení, kdy vznikne ve rmutu alkohol, z třapin vyluhoval a přešel by do vína. Toto víno by pak dostalo nepříjemnou travní příchut'. Tato příchut' působí rušivě na chuť vína a kromě toho by se z třapin vyluhovaly další látky jako bílkoviny apod., které by stěžovaly samočištění vína. Proto se musí všechny modré hrozny určené na výrobu červeného vína odzrnit.[8]

2.1.7.2 Úprava rmutu

Neprovádí se u dobře vyzrálých hroznů. Při nedostatečném vyzrání hroznů se musí rmut ještě před kvašením upravit, aby hotové víno mělo všechny potřebné vlastnosti. Upravuje se přidáním řepného krystalového cukru. Kdyby se do rmutu nepřidal cukr, víno by mělo nedostatečný obsah alkoholu a mělo by i slabou barvu.[8]

2.1.7.3 Nakvášení rmutu

Tato metoda se používá k získání červeného barviva ze slupek hroznů. Proto se musí modré hrozny nechat nakvasit ve slupkách a vzniklý alkohol a částečně i teplo vyluhují ze slupek barvivo, které pak dodává vínu sytě červenou barvu. Délka nakvašení se nedá pevně stanovit, ale řídí se zase stavem vyzrání hroznů, obsahem kyselin, způsobem nakvášení a míchání. Délku nakvášení je nutno kontrolovat a v nevhodnější době se musí nakvášení přerušit tím, že se rmut vylisuje.

Nakvášení můžeme provádět v otevřené nádobě. Je to nejjednodušší způsob a při pečlivém míchání rmutu se dosáhne velmi dobrých výsledků. Nevýhodou při této metodě je, že vzniká na povrchu rmutu klobouk, který se skládá ze slupek bobulí. V klobouku je velké množství kvasinek, které přeměňují cukr na alkohol, přičemž se uvolňuje teplo. Při zvýšení teploty by se oslabila činnost kvasinek a vzniklo by vhodné prostředí pro rozvoj octových bakterií a bakterií mléčného kvašení. Proto se musí klobouk do moštu ponořovat, aby se zabránilo vzniku vysokých teplot rozšiřování nežádoucích mikroorganismů a aby se umožnilo dokonalejší vyluhování barviv. Vzhledem k obtížnému míchání se někdy do nádoby umísťuje dřevěné víko, které tlačí klobouk dolů.

Nakvášení v uzavřené nádobě má pouze tu výhodu vůči nakvášení v otevřené nádobě, že celá kvasná kád' je uzavřena, tím se sníží možnost infekce ze vzduchu.[8]

Nakvášení pod tlakem oxidu uhličitého spočívá v tom, že rmut se nakvasí při současném působení tlaku oxidu uhličitého. Při použití oxidu uhličitého při nakvášení červeného rmutu postačí menší množství oxidu siřičitého.[7]

Vyluhování barviva horkým rmutem. Metoda spočívá v tom, že se rmut zahřeje k bodu varu a pak se naleje na ostatní rmut. Působením horkého rmutu se barvivo vyluhuje ze slupek. Po zchlazení se rmut ihned lisuje, aby nezačal kvasit.

Způsob „přes čtyři“ spočívá v tom, že se na rmut z modrých hroznů nalije takové množství vína, aby obsah alkoholu ve rmutu dosáhl 4 % objemu. Alkohol vyluhuje ještě část barviva před kvašením a současně zabrání rozvoji nepříznivých organismů.[8,11]

2.1.7.4 Lisování červeného rmutu

Lisování červeného rmutu je ztíženo tím, že ve rmutu nejsou třapiny, které by zabránily stlačit rmut tak, aby mošt přestal odtékat. Slupky jsou kvašením rozrušené a celý rmut je v takovém stavu, že se nemůže lisovat rychle, protože by vystříkával z lisu. Mošt po vylisování se dokvasí v ležáckých sudech. Na sudech jsou kvasné zátky, aby bylo možno sledovat dokvácení. Po překvácení u podezřelých vín je třeba nechat zjistit obsah těžkých kyselin, zejména kyseliny octové. Při obsahu těžkých kyselin považujeme víno za nemocné a podle toho jej ošetřujeme, aby se úplně nezneškodilo. Červené víno je třeba stáčet dřív než víno bílé.[8]

2.1.7.5 Speciální postupy kvašení

Jsou to postupy kvašení, při nichž můžeme získat růžové víno a růžové víno pod názvem Schilcher. Mezi tyto postupy patří např. macerace oxidem uhličitým nebo studená macerace.[8]

2.1.8 Vinařské oblasti – podoblast velkopavlovická

Víno, s nímž jsem dělala měření, pochází z vinařské podoblasti velkopavlovické.

Vinařská podoblast velkopavlovická je největší z podoblastí České republiky. Zde kralují především modré odrůdy vysazené na půdách s vysokým obsahem hořčíku. Viniční plochy se táhnou od kdysi hlavního střediska regionu města Hustopeče, přes Starovičky, Velké Pavlovice, Bořetice, Vrbici, Čejkovice a Kobylí až do města s největší rozlohou vinic ve svém katastru Velkých Bílovic. Tato krajina je srdcem produkce červených vín na Moravě. Do podoblasti velkopavlovické spadá jihomoravská metropole Brno. Hustopeče se nacházejí mezi Brnem a Břeclaví.[12] V obci ověněné ze severní strany velkým počtem přírodních vinařských hor se rozmohlo městské vinařství, jehož základem byly vinice svobodně držené měšťany hustopečskými a celou řadou měšťanů z Brna, Olomouce i jiných lidí přespolečných. Vedle Mikulova bývaly Hustopeče s rozlohou 766 ha vinic největším střediskem obchodu. V druhé polovině 15. století se ujalo v oblasti pěstování modrých odrůd révy vinné a jejich plochy se rozšiřovaly i v 16. století. Větší množství modrých odrůd se začalo pěstovat kvůli oblibě těchto vín a nemusel se z červených vín už platit desátek. Pěstovalo se tu ve starší době hlavně Rulandské modré, Frankovka a později Portugalské modré. Teprve v polovině 20. století přibylo ve větší míře Svatovavřínecké, Zweigeltrebe a André. Všechny modré odrůdy tu nacházejí výborné podmínky, a to hlavně v předních viničních horách s nižší nadmořskou výškou a s dlouhým teplým podzimem, kdy se rychleji snižuje obsah kyselin ve vínech a tvoří nečervené barvivo. Na nejlepších jižních plochách tu má výbornou jakost Veltlínské zelené s jemnou lipovou vůní. Výbornou pověst si získala odrůda Tramín z Hustopečí, Velkých Pavlovic a Němčiček. Výše položené vinice Kloboucka jsou známé odrůdou Neuburské, které tu dosahuje výrazného charakteru a plnosti. Méně příznivě exponované svahy jsou využívány odrůdou Miller-Thurgau, jejíž vína jsou častými komponenty do směsí různých známkových vín, podobně jako Ryzlink vlašský z této oblasti.[1]

Velkopavlovická vinařská podoblast



Obr. 4 Mapa velkopavlovické vinařské podoblasti. Převzato z [12]

2.1.9 Vybraná odrůda

Experiment byl prováděn s odrůdovým vínem Rulandské modré.

Je to stará odrůda pocházející z Francie a je rozšířena po celém světě. Nese téměř všude původní francouzský název Pinot noir. Tuto odrůdu nechal císař Karel IV. dovézt do Čech z Francie a první sazenice věnoval majitelům hor viničních u Mělníku. Na Moravě ji nalezneme v menším zastoupení ve všech vinařských podoblastech. Odrůda vyžaduje nejlepší polohy. Na hlinité půdě dává odrůda vína plná a tmavších barev. Na štěrkovité pak vína světlejší, ale s velmi jemnými vůněmi. Odolnost proti mrazu dobrá, proti houbovým chorobám střední. Tenká slupka snadno podléhá hnilobě. Sklizeň probíhá od konce září. Plodnost je pravidelná a dobrá. Vína odrůdy Rulandské modré mívají různý charakter, podle světových oblastí kde se odrůda pěstuje. Vína ohromují svojí plností, která se zráním zvyšuje. Vína se hodí pro dlouhodobé skladování. Barva vína bývá bledě rubínová až cihlově červená, s nazlátlým okrajem. Vůně mívá ovocné tóny. Chuť vína je plná, nízký obsah kyselin, velmi jemné třísloviny, hebkost při klouzání po jazyku. Ve vůni a chuti můžeme hledat ostružiny, maliny, jahody, černé třešně, brusinky, ve vyzrálých kouř hořícího dřeva, sušené švestky, povidla, hořké mandle hořkou čokoládu. Z odrůdy se nedělají jen vína červená, ale v některých oblastech jsou oblíbená vína růžová buď jen z Rulandského červeného, nebo ve směsi s Rulandským šedým.[12]



Obr. 5 Hrozen odrůdy Rulandské modré. Převzato z [12]

2.2 Organické kyseliny ve víně

Kyseliny, především pak vícesytné kyseliny, jsou významnými složkami vín. Ovlivňují chování vína v čase, jeho stabilitu, a mnohé další reakce. Ve víně jsou zastoupeny kyseliny jednosytné, vícesytné i aromatické. Mnohé z nich obsahují i jiné funkční skupiny, jsou to např.: aldehydokyseliny, hydroxykyseliny, ketokyseliny, aminokyseliny, merkaptokyseliny a jiné. Výraznými vonnými a chuťovými projevy se vyznačují především nižší mastné kyseliny, které jsou často významnými prekurzory (výchozími látkami) pro syntézu dalších vonných sloučenin.[13]

Organické kyseliny mají výrazný vliv na organoleptické vlastnosti (chuť, barvu a aroma), pH nebo na stabilitu a mikrobiologické procesy při výrobě vín.[14,15,16,17] Tyto kyseliny pocházejí z hroznů a z procesů, jimž jsou hrozny vystaveny, jako alkoholická fermentace, malolaktická fermentace, oxidace ethanolu atd.[18,19] O kyselinách je známo, že mají menší náchylnost ke změnám během výroby a skladování než jiné složky vína.[21] Kvantitativní analýza organických kyselin je důležitá pro kontrolu kvality vína.[21,22,23,24]

Hlavní organické kyseliny zdravých hroznů jsou tři. Výjimečné postavení mezi nimi má pro své fyzikálně chemické vlastnosti a relativně vysokou mikrobiologickou stabilitu kyselina L-(+)-vinná. Ze všech významných organických kyselin moštu a vína je také nejsilnější. Révovité rostliny jsou jejím jediným přírodním zdrojem, což významně ovlivňuje spolu s hojným používáním v potravinářském průmyslu její cenu. Ve vyzrálých hroznech také mezi kyselinami zcela převládá. Její koncentrace v době zaměkání dosahuje hladiny 15 g/l a během zrání klesá v našich podmínkách na hodnoty v průměru kolem 6 g/l. V jižních zemích její pokles pokračuje dále až na hodnoty 2 – 3 g/l.

Na rozdíl od kyseliny vinné se kyselina L-(-)-jablečná vyskytuje ve všech živých organismech. Svě jméno získala podle hojného výskytu v zelených jablkách, ale tvoří hlavní část kyselin v nezralých plodech většiny ovocných druhů. Na počátku zaměkání dosahuje koncentrace kyseliny jablečné až 25 g/l, ale v průběhu čtrnácti dnů klesne její hladina na polovinu a poté pozvolna klesá v našich oblastech na hladinu 4 – 6,5 g/l, zatímco v jižních oblastech až na 1 – 2 g/l. Z biologického hlediska není kyselina jablečná příliš stálá a je využívána mnoha druhy mikroorganismů.[25] V průběhu malolaktické fermentace dochází k přeměně kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou.[26,27,19]

Co do obsahu ve zdravých hroznech je nejméně zastoupena kyselina citrónová.[19] Její koncentrace v plně zralosti hroznů dosahuje podle odrůdy 0,1 – 1 g/l a její obsah nepodléhá tak výrazným změnám.

Z ostatních organických kyselin jsou pro své redukční vlastnosti významné kyselina askorbová (vitamin C) a kyselina kaftanová, které se vyskytují v řádech jednotek až desítek mg/l, ale jejich příspěvek k celkové kyselosti je zanedbatelný.[25]

Po napadení hroznů plísní šedou (*Botrytis cinerea*) se složení kyselin i jejich obsah v moštu mění. Působením *Botrytis cinerea* dochází podle způsobu a stupně napadení k rozkladu výše zmíněných tří kyselin. Degradace kyselin ušlechtilou formou plísně je mírnější, zatímco modrá hniloba je schopna odbourat až 90 % kyselin v porovnání se zdravými hrozny. Přesto dochází k výraznému odkyselování, protože působením plísně se tvoří tzv. cukrové kyseliny, které vznikají oxidací koncových uhlíků jednotlivých sacharidů. Z D-glukosy vzniká D-glukonová kyselina, z fruktosy 2-keto-D-glukonová kyselina a z D-galakturonové kyseliny, která tvoří základ pektinů, kyselina slizová. Pro tvorbu těchto sloučenin platí stejné pravidlo jako pro degradaci normálních kyselin. Na masivní tvorbě

cukrových kyselin v hroznech napadených hnilobnou formou se navíc významně podílejí i bakterie. Ušlechtilá plíseň zpravidla netvoří více než 3 g/l glukonové kyseliny.[25]

Z hlediska stability vína představuje hlavní problém kyselina slizová, jež tvoří nerozpustnou vápenatou sůl, vytvářející drobnou krupičku. Podobně jako soli kyseliny vinné má i slizan vápenatý tendenci k přesyceným roztokům. Jeho vyloučení je tedy velmi obtížně předvídatelné a často se stane, že u staršího, zdánlivě stabilního vína z velmi vyzrálých hroznů dojde najednou k tvorbě závojovitého zakalení. Tento zákal nemá žádný vliv na sensorické vlastnosti vína na rozdíl od zákalů biologického původu, jimž je podobný.[25]

Z praktického hlediska je důležitá skutečnost, že množství a skladbu kyselin je možné ovlivnit způsobem pěstování a vhodnými agrotechnickými zásahy. Na počátku zaměkání je koncentrace kyselin kolem 30 g/l a je celkem nezávislá na odrůdě, poloze vinice, vedení révy nebo zatížení keře. Další vývoj koncentrace kyselin na těchto faktorech však rozhodně závislý je.[25]

Dominantní vliv na celkovou aciditu mají kyseliny vinná a jablečná a z technologického hlediska je pak důležitý jejich poměr, který je indikátorem kvality ročníku.[14] Rozhodující účinek na obsah kyselin v hroznech má teplota, protože rychlost odbourávání obou kyselin stoupá s průměrnou teplotou hroznů. Kyselina jablečná je na teplotu hroznů citlivější než kyselina vinná.[25]

Čím jsou hrozny dále od země, tím jsou méně vystaveny akumulovanému teplu sálajícímu ze země a více ochlazovány prouděním ze vzduchu. Vysoké vedení révy proto zpomaluje odbourávání kyselin a terpenických látek, jež se chovají podobně. Naopak nízké vedení podporuje odbourávání kyselin a urychluje fenolickou zralost hroznů tak důležitou pro výrobu kvalitních červených vín.[25]

Slunění hroznů v průměrném roce má pozitivní vliv na obsah a složení kyselin a fenolické vyzrávání. Masivní odkrytí hroznů vede k výraznému zvýšení jejich teploty, které může vést až k jejich fyzickému poškození. Odbourávání kyselin postupuje velmi rychle, kyselina jablečná klesá pod žádoucí hladinu a celkový obsah kyselin je příliš nízký. Během zrání může v krajním případě klesnout až na hladinu 3 – 4 g/l, přičemž většinu bude tvořit kyselina vinná, navíc vázaná ve formě vinného kamene. Nízká hladina kyseliny jablečné je při vyšším pH mladého vína velice náchylná na spontánní biologické odbourávání, které navíc mohou uskutečnit nežádoucí kmeny bakterií.[25]

Kromě kyselin se rychle odbourávají i terpenické aromatické látky typické pro muškátové odrůdy. Teplotní stres vede k produkci ochranných látek fenolické povahy, které ke kvalitě bílých vín také nepřispívají. Na tyto nežádoucí důsledky nepřiměřeného odkrytí hroznů jsou nejcitlivější aromatické a červené odrůdy. Naopak u odrůd modrých jde o pochody významně přispívající ke kvalitě červených vín.[25]

Jednou z možností jak zvyšovat obsah kyselin nepřirozenou cestou je jejich přidávání do moštu. Nejpřirozenější je přidávek kyseliny vinné a to i z etického hlediska. Použití kyseliny jablečné je typické pro jižní vinařské regiony, kde se používá pro zvýšení svěžesti místních dosti fádnicích vín. Přikyselení kyselinou jablečnou v relevantním množství je dobře prokazatelné, protože se vyskytuje v moštu a víně v koncentracích v řádu desítek mg/l. Další kyselinou je kyselina citrónová. Její přirozený obsah ve víně je několik desetin g/l, a proto její přidávek je opět prokazatelný. Největší problém představuje její odbourávání mnoha druhy bakterií, kdy se tvoří řada sensoricky nepříjemných vedlejších produktů, jako kyselina octová, acetoin nebo diacetyl. Samotná kyselina citrónová je sensoricky výraznější. Málo známou možností je použití kyseliny mléčné, která je sensoricky jemná, mikrobiologicky vysoce

stabilní, nevytváří nerozpustné sloučeniny a tvoří přirozenou součást vína. Dosud je hlavní překážkou pro její použití dosti výrazný a nepříjemný odér.[28]

Pokles obsahu kyselin může mít několik důvodů: (1) Ředění kyselin jako důsledek zvětšování objemu bobule. (2) Zvýšení toku draslíku do bobulí, kdy dochází k tvorbě solí a snížení celkové koncentrace kyselin a hodnoty pH. (3) Přeměna organických kyselin na cukry. (4) Zvýšení propustnosti buněčných membrán, a tím vyšší prodýchání kyselin.[29]

Tvorba optimálního obsahu kyselin může být negativně ovlivňována následujícími faktory:

(1) Vysokými a nízkými teplotami, které mohou negativně ovlivňovat fotosyntézu, jež je optimální při teplotách 25 – 30 °C. Výkonnost fotosyntézy se snižuje při teplotách nad 30 °C a zastavuje se při teplotách nad 35 °C. (2) Stresovými podmínkami způsobenými silným prouděním větru nebo nedostatkem vody. Sucho, nebo naopak nadměrné vlhko může vést k nízkým hodnotám obsahu kyselin. (3) Nedostatkem živin, nebo naopak přehnojením draslíkem a dusíkem. (4) Napadením listů nebo hroznů houbovými chorobami.[29]

2.3 Metody stanovení organických kyselin ve víně

2.3.1 Spektrofotometrické metody

Spektrofotometrické metody jsou založeny na reakci organických kyselin s jistou látkou, čímž se vytvářejí sloučeniny nebo barevné komplexy, které jsou měřitelné při určité vlnové délce. Aby se zabránilo jejich interferenčním chybám, jsou organické kyseliny izolovány pomocí procesu srážení např. iontově výměnným sorbetem.[18]

2.3.2 Enzymatické metody

Enzymatické metody se používají převážně pro kvantifikaci u jablečné, mléčné a citrónové kyseliny u hroznových šťáv a vín. Pomocí této metody je však možné stanovit i jiné kyseliny jako vinnou, octovou, L-askorbovou, mravenčí, D-isocitronovou, šťavelovou a kyselinu jantarovou, poměr kyseliny dehydroaskorbové a L-askorbové a poměr kyseliny D-glukonové a D-glukonolaktanu. Tyto metody jsou založeny na měření poklesu absorbance koenzymů NADH (nikotinamidadeninukleotid v redukované formě) nebo NADPH (nikotinamidadeninukleotidfosfát v redukované formě), které mají absorpční maximum 340 nm. Hlavní výhodou těchto metod je jejich vysoká přesnost, a možnost rozlišení L- a D-izomerů. Nicméně při každém stanovení lze sledovat pouze jednu organickou kyselinu, což je hlavní nevýhodou zmíněné metody. Automatizace těchto metod za účelem snížení nákladů a času potřebného k analýze, spočívá v použití vstřikovací analýzy. Enzymatické metody jsou někdy používány jako referenční metody pro validaci HPLC nebo CZE.[18]

2.3.3 Chromatografické metody

2.3.3.1 Chromatografie tenké vrstvy (TLC)

Chromatografie v plošném uspořádání – např. chromatografie na tenké vrstvě - vlastní dělení probíhá na tenké vrstvě adsorbentu (nosiče) naneseného na skleněné nebo hliníkové fólii z plastu či hliníku. Mobilní fází je kapalina, jejíž pohyb pevnou fází je vyvoláván kapilárními silami. K dělení dochází na základě rozdělovacího mechanismu, adsorbce nebo výměny iontů.

Pomocí této metody byly identifikovány a separovány kyselina vinná, jablečná, mléčná, jantarová, citrónová v hroznové šťávě a u vín.[18].

2.3.3.2 Plynová chromatografie (GC)

Navzdory své velké citlivosti a selektivnosti, je GC zřídka používána pro určení organických kyselin. Většina organických kyselin s krátkým řetězcem není těkavá, takže je nezbytné provádět derivatizaci na trimethylsilylové deriváty (TMS), methylestery, terc-butylodimethylsilyl deriváty (TBDMS), nebo ethylestery. Vzhledem ke složitému složení hroznové šťávy a vín, je někdy nezbytné před derivatizací organické kyseliny izolovat. Tato izolace se obvykle prováděla srážením olovnatých solí, iontově výměnným sorbetem nebo extrakcí na tuhou fází kazet. Pomocí těchto kroků čas pro přípravu vzorků podstatně narůstá a tyto GC metody jsou zdlouhavé. Pro snížení času potřebného k přípravě vzorků se

sjednotily kroky separace a derivatizace na estery přímo v iontově výměnném sorbentu, kde organické kyseliny byly izolovány během 60 min. při teplotě do 90 °C. V dnešní době některé organické kyseliny jako octová, mléčná nebo jablečná mohou být určeny pomocí plynové chromatografie přímo, bez této derivatizace. Jako detektory se nejčastěji používají plamenový ionizační detektor (FID) a hmotnostní spektrometr (MS). Závěrem, volba metody pro určení těchto sloučenin je velmi omezena díky svým nákladům a komplexnosti. Jinými a mnohem vhodnějšími možnostmi pro určení organických kyselin u hroznových šťáv a vín jsou kapalinová chromatografie nebo kapilární elektroforéza.[18]

2.3.3.3 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie se používá pro určování organických kyselin v hroznové šťávě a vínech nejčastěji.[18]

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Metod HPLC k určení organických kyselin v hroznové šťávě a vínech je mnoho [30], nicméně ve vědeckých pracích jsou velké rozdíly. Podle předběžné úpravy vzorku mohou být rozděleny do dvou skupin. V první skupině jsou vzorky pouze zředěny a filtrovány, kdežto ve skupině druhé je použito mnohem komplexnějšího postupu. Většina studií určení organických kyselin u hroznové šťávy a vín užila uvedených postupů, aby nedošlo k interferencím s cukry nebo barvivy, které by mohly reagovat s organickými kyselinami. Nejběžnějším postupem je extrakce iontově výměnným sorbentem nebo extrakce na tuhé fázi (SPE kolony) a derivační postupy. Bylo zjištěno, že přímý nástřik s předcházejícím naředěním a filtrací vykazuje lepší výsledky než postup s extrakcí na tuhé fázi.[31] Byl vyvinut plně automatický systém přípravy vzorků s on-line dialýzou před analýzou HPLC.[32,33] Tím byly odstraněny makromolekulární i mikromolekulární interference pocházející z komplexních matic. Zmíněný systém byl použit pro analýzu hroznové šťávy a vín a bylo dosaženo dobrých výsledků co do opakovatelnosti a citlivosti této metody. Ovšem obecně vzato extrakce a izolace organických kyselin jsou zdlouhavé, drahé a časově náročné.[18]

Na druhé straně byly vyvinuty metody s odlišnými mechanismy separace např. vysoce účinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi (*Reverse-Phase High-performance Liquid Chromatography - RP-HPLC*) a vysoce účinná kapalinová chromatografie s iontově výměnnými fázemi (*Ion-exchange High-performance Liquid Chromatography - IE-HPLC*) nebo iontově vylučovací HPLC. RP-HPLC se uvádí jako nejčastěji používaný mechanismus separace organických kyselin ve víně. Separace se provádí za izokratických podmínek a se slabě zředěnou kyselinou jako elučním činidlem. Výsledný signál je potom detekován na UV detektoru.[15] Další vyvinutou metodou byla iontově vylučovací HPLC s refraktometrickou a elektrochemickou detekcí umožňující stanovení hlavních organických kyselin v hroznových šťávách a vínech.[34]

Předností obou metod je jednoduché zpracování vzorků, jejich nevýhodou je menší citlivost. Proto byla vyvinuta další metoda IE-HPLC s dvěma detektory zapojenými do série (UV a RI) pro přímé určení organických kyselin v hroznové šťávě a vínech. Použití této metody umožnilo snížit dobu a náklady na tuto analýzu a organické kyseliny, cukry a alkoholy byly určeny simultánně s přijatelnými výsledky. Bylo provedeno srovnání analýzy

organických kyselin v hroznové šťávě a vínech pomocí HPLC za použití reverzní fáze a IE-HPLC. Výsledkem bylo zjištění, že HPLC za použití reverzní fáze je vhodná metoda k určení přítomnosti vinné, jablečné a mléčné kyseliny, ale u citrónové a octové kyseliny lze dosáhnout lepších výsledků pomocí metody IE-HPLC.[18]

Při srovnání tří chromatografických systémů (IE-HPLC, iontově vylučovací HPLC a RP-HPLC) se dospělo k závěru, že nejpřesnější data byla dosažena pomocí metody iontově vylučovací HPLC, nicméně metoda RP-HPLC byla při analýze nejrychlejší.[35] Výhody metody IE-HPLC jsou nepřítomnost interferencí a jednodušší zpracování vzorků.[18]

Iontová chromatografie

Iontová chromatografie s vodivostní detekcí umožňuje separovat a kvantifikovat organické kyseliny ve vzorcích hroznové šťávy a vín.[36] Tento postup má své výhody vzhledem ke svému použití, jsou to přesnost a citlivost při určení organických kyselin, například detektor vodivosti a minimalizace interferencí cukrů. U těchto metod předběžná komplexní příprava vzorků jako je extrakce a/nebo derivace nejsou nutné. Tento druh chromatografie je vhodnou metodou pro určení vzorků s velmi nízkým množstvím organických kyselin nebo u rutinních analýz.[18]

2.3.3.4 Elektroforézní metody

V posledních letech byla kapalinová chromatografie z velké části nahrazena kapilární elektroforézou při určování organických kyselin. Tyto kyseliny byly stanovovány u rozličných matic, např. klinické vzorky, vzorky ze životního prostředí nebo vzorky jídla. Kapilární elektroforéza je analytická separační metoda, která má mnoho výhod jako jsou vysoké rozlišení, jednoduchost a možnost automatizace, rychlost analýzy, nízkou spotřebu činidel a vzorků, a minimální přípravu vzorků i u složitých matic. Co se týká hroznové šťávy a vín, nedávno se objevilo mnoho postupů pro určení organických kyselin pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE).[36] Jednoduchost předběžné přípravy vzorků je jednou z předností CZE, neboť touto metodou můžeme separovat malé molekuly ve složitých maticích. Proto je požadováno pouze zředění a odfiltrování vzorků u většiny postupů. S ohledem na způsob dávkování vzorků, bylo použito dvou metod pro určení organických kyselin u hroznové šťávy a vín: hydrodynamické a elektrokinetické dávkování.[18]

Hydrodynamické dávkování vzorků je nejpoužívanější metodou. Může být doprovázeno aplikací tlakového nástřiku (na konci vstřiku nebo kapiláry), vakua (na detekčním konci nebo kapiláře) nebo výplachem pomocí zvednutí nádrže injekce úměrně k hlavní nádrže. Objem dávkovaného vzorku téměř nezávisí na matici vzorku, přestože závisí na viskozitě. Málo metod používá elektrokinetické dávkování, kdy je při konečném dávkování nahrazen zásobník vialkou se vzorkem a za použití napětí. Proto je odebrané množství vzorku závislé jednak na elektroosmotickém toku, vodivosti a viskozitě základního elektrolytu a vzorku a na elektroforézních mobilitách analytů. Použití elektrokinetického dávkování zvyšuje citlivost CZE, ale znehodnocuje matici vzorku. a způsobuje menší přesnost stanovení. Proto použití této metody není vhodné pro kvantitativní stanovení. Jsou-li brány v úvahu elektroforézní podmínky, složení elektrolytu je velmi důležité k tomu, aby bylo dosaženo dobré CE separace.[18]

U hroznové šťávy a vín, bylo použito několik typů pufrů jako jsou bis (2-hydroxyethyl) imino-tris (hydroxy-methyl) aminomethan (BISTris), kyselina boritá, 1,3,5-benzotrikarboxylová kyselina (BTA), chroman, 4-aminobenzoová kyselina (PAB), fosfát, ftalát, kyselina pyridindikarboxylová (PDC), kyselina pyromellitová (PMA) nebo tetraboritan. Dále bylo použito i několik typů elektroosmotických modifikátorů průtoku (kationaktivních tenzidů) jako jsou cetyltrimethylammonium bromid (CTAB), kyselina ethylendiamintetrakarboxylová (EDTA), myristyltrimethylammonium bromid (MTAB), tetradecyltrimethylammonium bromid (TIAB) nebo tetradecyltrimethylammonium hydroxid (TTAOH), které byly přidány do základních elektrolytů (BGE), aby otočily tok elektroosmózy. Většina použitých metod využívá kapilár z neobaleného křemenného skla s přidaným kationtovým činidlem, ale absorpce směsi na stěny způsobuje problémy s reprodukovatelností. Proto se používá potažených kapilár, aby nedocházelo k elektroosmotickému toku a přidavek kationtových činidel tak není nutný.[18]

Z výše uvedeného vyplývá, že CZE je schopná nahradit pět současných metod, které se používají při analýzách organických kyselin: HPLC, IC, enzymatické, destilační a kolorimetrické metody. Výsledky CZE metody byly v uspokojivé shodě s výsledky dosaženými při použití IC, kolorimetrické a destilační metody. Enzymatické metody se dají hůře srovnávat s CZE metodami. Tyto rozdíly mohou být vysvětleny skutečností, že enzymatická metoda je určena pro L-izomery, zatímco metoda CZE určuje jak D- tak i L-izomery jako jeden vrchol. Většina CZE metod umožňuje určit hlavní organické kyseliny v hroznové šťávě (vinnou, jablečnou a citrónovou) a u vín (vinnou, jablečnou, citrónovou, kyselinu jantarovou, octovou a mléčnou). Konečně hlavními nevýhodami kapilární elektroforézy je její nízká reprodukovatelnost, ve srovnání s enzymatickou a chromatografickou metodou.[16,18]

2.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se stala během svého vývoje jednou z nejužitečnějších technik pro analýzu organických látek, zejména biochemicky významných.

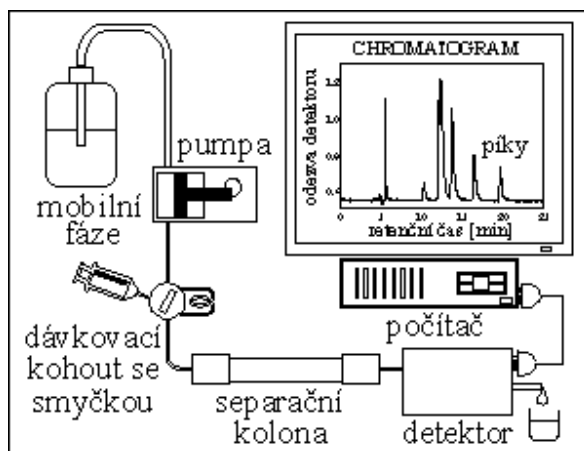
Úspěšné analýzy, tedy dobré separační účinnosti, reprodukovatelnosti retenčních časů a přesných kvantitativních dat – lze dosáhnout pouze při použití kvalitní chromatografické kolony v kvalitním přístroji, který umožňuje přesně kontrolovat složení a průtok mobilní fáze, teplotu kolony a pracovní režim detektoru. Účinné separace a vysoké citlivosti analýzy lze dosáhnout především použitím účinných kolon, spojovacího potrubí a cel detektorů s minimálním vnitřním objemem a takové konstrukce detektoru, která zaručuje stabilní signál a vysoký poměr odezvy k šumu i při vysokém nastavení citlivosti detektoru. K urychlení analýzy přispívá použití poměrně vysokých průtoků mobilních fází nebo krátkých kolon plněných velmi účinnými náplněmi s malým průměrem částic, zapisovačů a detektorů s rychlou odezvou a automatické zpracování dat.[37]

2.4.1 Princip HPLC

HPLC je separační (dělicí) a současně i analytická metoda, (tj. poskytuje kvalitativní a kvantitativní informace o vzorku). Využívá distribuce látek mezi dvě fáze: mobilní (pohyblivou) - eluent a stacionární (nepohyblivou) – sorbent.[38]

Na začátek kolony je nanesen objem vzorku. Kolona je naplněna stacionární fází a protéká jí mobilní fáze, kterou je unášen vzorek. Látky interagují jak se stacionární fází (rozpuští se v ní, adsorbují se, reagují s ní za vzniku sloučenin), tak i s mobilní fází. Pokud se separační funkce obou dělených látek od sebe dostatečně liší, dojde k částečnému nebo úplnému rozdělení látek do izolovaných pásů. Po výstupu látky z kolony indikuje detektor přítomnost této látky v mobilní fázi a zaznamená pík (obr. 6).

Průchodem separované látky kolonou přejde každá molekula vzorku mnohokrát z protékající mobilní fáze do stacionární fáze a zpět. Doba, po kterou separovaná látka setrvává ve stacionární fázi, závisí na velikosti interakcí a určuje pořadí, v jakém složka vychází z kolony. Čím větší jsou interakce látky se stacionární fází, tím delší je retenční čas.[37]



Obr. 6: Kapalinový chromatograf. Převzato z [38]

2.4.2 Instrumentace HPLC

2.4.2.1 Čerpadla

Čerpadla mobilní fáze používaná v moderních kapalinových chromatografech musí být konstruována z materiálů odolných vůči korozi i při použití poměrně agresivních mobilních fází (roztoky pufrů, slabých kyselin a bází, různá organická rozpouštědla), k čemuž se hodí nerezová ocel, titan či některé keramické materiály. Čerpadla by měla mobilní fázi dávkovat plynule bez kolísání průtoku do tlaků 30 – 50 MPa v rozmezí průtoku 0,1 ml.min⁻¹ do 5 - 10 ml.min⁻¹, protože kolísání průtoku významně ovlivňuje jak přesnost retenčních dat, tak i ploch píků.

Vnitřní objem čerpadel má být co nejmenší, aby umožnil rychlou výměnu mobilní fáze a práci s gradientem mobilní fáze tvořeným v nízkotlaké části přístroje.

Vzhledem k těmto požadavkům se již nepoužívají čerpadla pneumatická nebo hydraulická, kde je zdrojem hnací síly buď stlačený plyn, nebo kapalina, neboť průtok kapaliny u těchto čerpadel závisí na hydraulickém odporu v systému. V současné době se při práci s analytickými kolonami téměř výhradně používají pístová čerpadla s malým objemem pístní komory, v nichž se kapalina střídavě vytlačuje a nasává rychlým pohybem mechanicky hnaného pístu přes dva zpětné ventily. Hlavní výhodou čerpadel s malým objemem pístní komory spočívá v tom, že umožňují dávkovat mobilní fázi bez přerušení a také umožňují snadnou a rychlou výměnu mobilní fáze.

Velmi důležité je dokonalé odplynění mobilní fáze před vstupem do čerpadla, aby nedocházelo k uvolňování bublinek rozpuštěných plynů (vzduchu) v sacích ventilech čerpadla, což by se projevilo snížením a kolísáním průtoku mobilní fáze. Uvolňování bublinek plynu v chromatografické koloně nebo v cele detektoru může vážně narušit i separační proces a vést k nevyhodnotitelnému chromatografickému záznamu.[37]

2.4.2.2 Dávkování vzorků

Konstrukce zařízení pro dávkování vzorku do chromatografické kolony může významně ovlivnit účinnost separace.

Dávkovací zařízení používající techniky nástřiku injekční stříkačkou přes septum nebo při zastaveném průtoku mobilní fáze již byla prakticky opuštěna a u moderních přístrojů se používají buď manuální smyčkové dávkovače na principu přepínacích ventilů, nebo automatické dávkovače, které umožňují dávkovat vzorek do kolony bez přerušení toku mobilní fáze.

Manuální smyčkové dávkovače umožňují buď dávkovat pouze konstantní objem vzorku daný celkovým objemem vnitřní smyčky dávkovače, nebo u dávkovačů speciální konstrukce lze plnit jen část dávkovací smyčky přesně odměřeným objemem vzorku z injekční stříkačky, což umožňuje dávkovat různé objemy vzorku. Jsou dostupné dávkovače s různými objemy smyček, od 0,2 µl až do 2000 µl.

Automatické dávkovače ve spojení se sadou speciálních skleněných mikronádobek uzavřených pryžovým septem jako zásobníčků vzorků, umístěných v pneumaticky ovládaných držácích, umožňují automaticky dávkovat mnoho vzorků po sobě i při obměňovaných pracovních podmínkách, bez zásahu obsluhy přístroje. To je výhodné

pro sériové analýzy velkého počtu vzorků, zejména pokud lze dávkovač ovládat řídicím počítačem, který současně kontroluje zpracování dat.[37]

2.4.2.3 *Chromatografické kolony*

Kolony pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii se v současné době zhotovují převážně z rovných trubic s hladkým vnitřním povrchem. Musí odolávat relativně vysokým tlakům, až do 60 MPa, chemickému působení mobilních fází a separovaných látek, na něž nesmí působit katalyticky. Hodí se bezešvé trubice s leštěným vnitřním povrchem z antikorozivní oceli nebo z niklu. Do tlaků asi 20 MPa lze použít i kolony ze speciálně vytvrzeného skla. Také byly vyvinuty analytické a preparativní kolony ve formě vložek z plastické hmoty, plněnými různými náplněmi, které se vkládají do speciálního pláště.

Rozměry kolon závisí na účelu, k němuž jsou použity, a na velikosti částic náplně. Pro analytické aplikace se v současné době většinou používá „konvenčních“ analytických kolon o délce 5–30 cm a vnitřním průměru 3–5 mm, plněných pórovitými náplněmi a částicemi o průměru 3–10 μm . Při volbě rozměrů kolony a velikosti náplně je třeba mít na paměti, že množství vzorku, které lze podrobit separaci, roste se čtvercem vnitřního průměru kolony, zatímco u dobře naplněných kolon účinnost separace ani doba analýzy na průměru kolony nezávisí. S rostoucí délkou kolony se úměrně zvyšuje účinnost separace, ale také i doba analýzy a pracovní tlak. Účinnost separace a pracovní tlak naopak klesají s rostoucím čtvercem průměru částic náplně.

V poslední době se intenzivně rozvíjí vývoj nových náplní kolon pro separaci biopolymerů, především peptidů a proteinů, aby bylo možno dosáhnout jejich rychlého dělení při zachování původní biologické aktivity. K takovýmto materiálům patří např. glykolmethakrylátové gely, materiály na bázi silikagelu povlečeného hydrofilní organickou vrstvičkou či materiály s chemicky vázanými několika vrstvami s různými hydrofilními a hydrofobními vlastnostmi [37].

2.4.2.4 *Detektory*

Prakticky všechny typy detektorů používané v HPLC jsou koncentračního typu, tj. poskytují signál (odezvu) úměrný koncentraci detekovaných látek v eluátu.

Nejpoužívanějšími detektory jsou fotometrické detektory pracující v ultrafialové a viditelné oblasti. Lze je dělit do čtyř základních typů. První jsou detektory, které pracují s jednou pevně nastavenou vlnovou délkou. Na stejném principu jsou založeny další detektory, u nichž lze volit mezi několika předem danými vlnovými délkami pomocí vyměnitelných interferenčních filtrů. Dále existují detektory vybavené polychromatickým zdrojem záření, které umožňují volit libovolnou vlnovou délku záření pro detekci. Posledním typem jsou spektrofotometrické detektory s rychlým záznamem spektra bez přerušení chromatografické separace založené na současném měření signálu velkého počtu miniaturních plošných fotodiod.

Princip detekce fluorimetrických a fosforimetrických detektorů je založen na tom, že látky s určitými funkčními skupinami v cele detektoru absorbují budící ultrafialové záření, jehož pohlcená energie se zčásti vyzáří ve formě luminiscenčního (fluorescenčního nebo fosforescenčního) záření o nižší energii (vyšší vlnové délce), než má záření excitační. Intenzita emitovaného záření je pro nízké koncentrace přímo úměrná koncentraci látky a měří

se fotonásobičem umístěným tak, aby na něj dopadlo pouze emitované, ale nikoli excitační záření. Fluorimetrické detekce se používá mnohem častěji než detekce fosforimetrické. Fluorimetrické detektory jsou vysoce selektivní a citlivé a uplatňují se při stopové analýze, zejména biochemicky významných látek.

Elektrochemické detektory jsou třetím nejčastěji používaným typem selektivních detektorů a slouží k detekci látek schopných elektrochemické reakce. Ampérometrické detektory měří proud vyvolaný průchodem redukovatelné či oxidovatelné látky průtokovou celou, v níž jsou umístěny elektrody s vloženým pracovním napětím nezbytným k průběhu elektrochemické reakce.

Dalšími, ale málo používanými detektory jsou vodivostní, reakční a refraktometrické detektory. Refraktometrické detektory řadíme mezi nespecifické (univerzální). Poskytují odezvu úměrnou rozdílu indexů lomu eluátu v měrné cele a srovnávací kapaliny (mobilní fáze) v referenční cele. Citlivost detekce je úměrná rozdílu indexu lomu látky a indexu lomu mobilní fáze, je však podstatně nižší než u specifických detektorů (fotometrických, fluorimetrických a elektrochemických). Dalšími nevýhodami jsou značná teplotní závislost odezvy a nemožnost použití k detekci při gradientové eluci.

Vodivostní detektory jsou nespecifické detektory měřící elektrickou vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami, na něž je vkládáno střídavé napětí, aby se zabránilo jejich polarizaci.

Reakční detektory využívají vhodné reakce analyzovaných látek s reakčním činidlem v eluátu z chromatografické kolony.[37]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a zařízení

3.1.1 Kapalinový chromatograf Waters 2487

Pro analýzu byl použit kapalinový chromatograf Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector s manuálním nástřikem vzorku a s izokratickou HPLC pumpou Waters 1515 firmy Waters Milford, USA. Detektor umožňuje měřit vlnové délky v rozsahu 190 nm – 700 nm. Naměřené hodnoty byly dále zpracovávány pomocí programu Breeze.



Obr. 7 Kapalinový chromatograf Water 2487

3.1.2 Chromatografická kolona ZORBAX SB-Aq

Kolona pro kapalinovou chromatografii od výrobce Agilent Technologies, USA.

Vlastnosti kolony:

Délka kolony: 150 mm

Šířka kolony: 4,6 mm

Velikost částic: 5 μ m

Rozsah pH: 1 - 8

Maximální tlak: 6000 PSI (1 PSI = $1/1,45 \cdot 10^{-4}$ Pa)

Maximální teplota: 80 °C

3.1.3 Dávkořav vzorku

K nadávkování vzorku byla použita laboratorní stříkačka HAMILTON Reno (Nevada, USA) o objemu 25 μ l.

3.1.4 Analytické váhy

K navařování byly použity analytické váhy HR-120-EC firmy HELAGO[®] CZ Hradec Králové. Parametry: kapacita 120 g, nejmenší dílek 0,1 mg, atest ČMI.

3.1.5 Chemikálie a vzorky

3.1.6 Vzorky

Vzorky pocházely z vinařské oblasti Morava, podoblasti velkopavlovické. Vzorky od vinaře, který vyráběl víno spontánním kvašením, byly odebírány od 8. října 2008 do 24. října 2008, první vzorek byl odebrán z mořtu a poté bylo provedeno dalších 10 odběrů v průběhu výroby vína. Vzorky od vinaře, který vyráběl víno řízeným kvašením, byly odebírány od 11. října 2008 do 24. října 2008 v průběhu výroby vína. Vzorky byly odebírány od počátku kvašení až po mladé víno. Vzorky byly uchovávány v mrazícím boxu při teplotě -18°C. Jeřtě před zmrazením byly přefiltrovány mikrofiltrem o velikosti 0,45 μ m.

3.1.7 Chemikálie

Pro přípravu mobilní fáze a standardních roztoků byly použity následující chemikálie:
Dihydrogenfosforečnan sodný, NaH₂PO₄; Lachema Neratovice
Kyselina fosforečná, H₃PO₄; Lachema Neratovice
Kyselina jablečná, C₄H₆O₅; Sigma-Aldrich
Kyselina mléčná, C₃H₆O₃; Sigma-Aldrich
Kyselina vinná, C₄H₆O₆; Sigma-Aldrich
Kyselina citrónová, C₆H₈O₇; ZMBD chemik

3.2 Příprava roztoku mobilní fáze

Jako mobilní fáze byl použit 20 mM fosfátový pufr. Bylo naváženo 1,3797 g NaH₂PO₄.H₂O, navážka byla kvantitativně převedena do 500 ml odměrné baňky a doplněna vodou pro HPLC po značku. Poté bylo upravováno pH pomocí kyseliny fosforečné na pH 2. Následně bylo provedeno ředění takto připraveného roztoku s acetonitrem v poměru 99/1. Takto zředěný roztok byl po dobu 5 minut v ultrazvukové vodní lázni zbaven vzduchových bublin.

3.3 Příprava standardu a vzorků

3.3.1 Příprava standardu

Byl vytvořen směsný standard o koncentraci 6 g/l. Do odměrné baňky na 100 ml bylo naváženo 0,6 g kyseliny vinné, 0,6 g kyseliny jablečné, 0,6 g kyseliny mléčné a 0,6 g kyseliny citrónové. Vše bylo doplněno vodou na HPLC po značku.

3.3.2 Příprava vzorků

Vzorky byly rozmrazeny a poté přímo nastříkovány na kolonu.

3.4 Vlastní měření

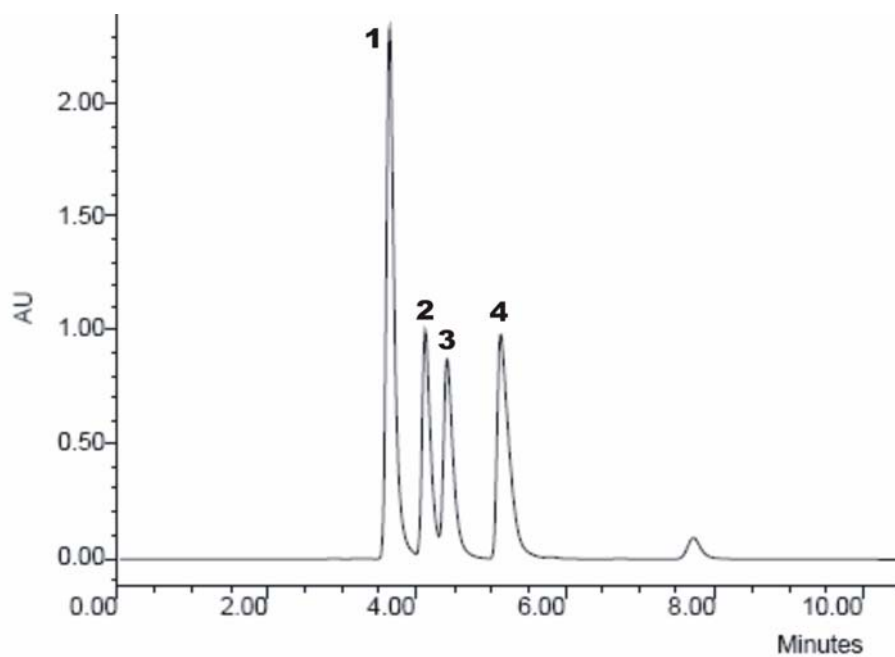
Směsné standardy a vzorky byly přímo nastříkovány na kolonu pomocí mikrostříkačky o objemu 25 μ l. Doba jedné analýzy byla zvolena na 20 minut, teplota kolony na 45 °C, průtok na 0,5 ml/min a UV detekce při 220 nm. Dávkovací smyčka měla objem 10 μ l.

3.5 Vyhodnocení výsledků

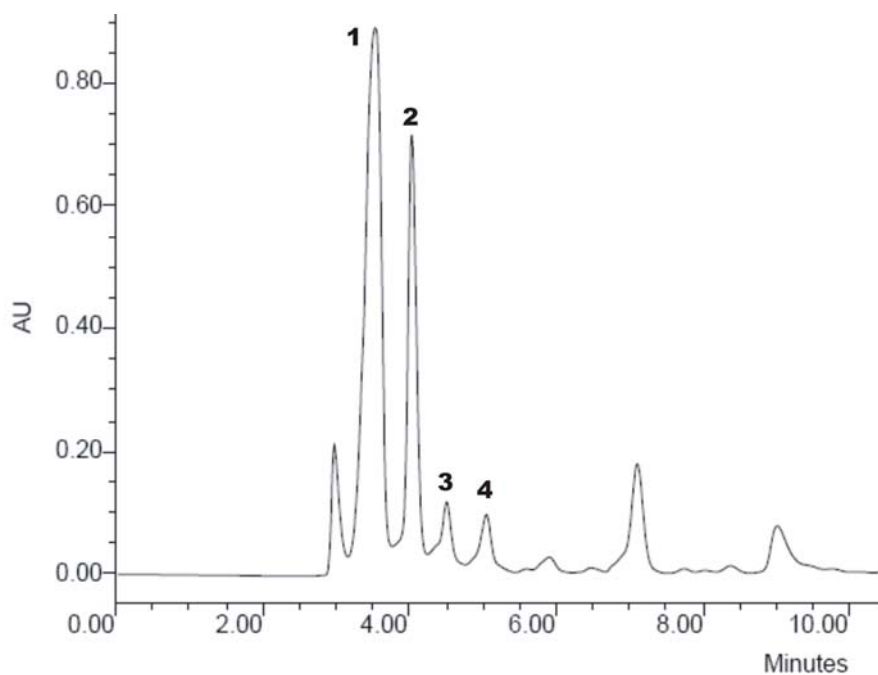
Retenční časy a plochy píků byly vyhodnoceny programem MS Excel. U každého vzorku byla provedena 3 paralelní měření, ze kterých bylo provedeno statistické zpracování výsledků. Byla vypočtena průměrná hodnota \bar{x} a směrodatná odchylka s_R (Tabulka 3 a 4)

4 VÝSLEDKY

4.1 Chromatogramy



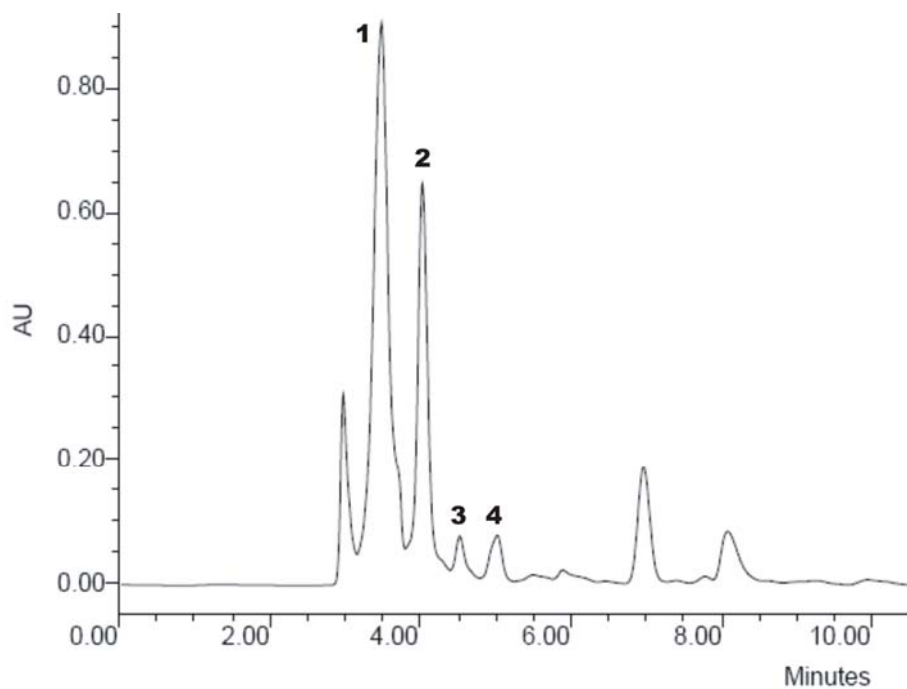
Obr. 8 *Standard organických kyselin*



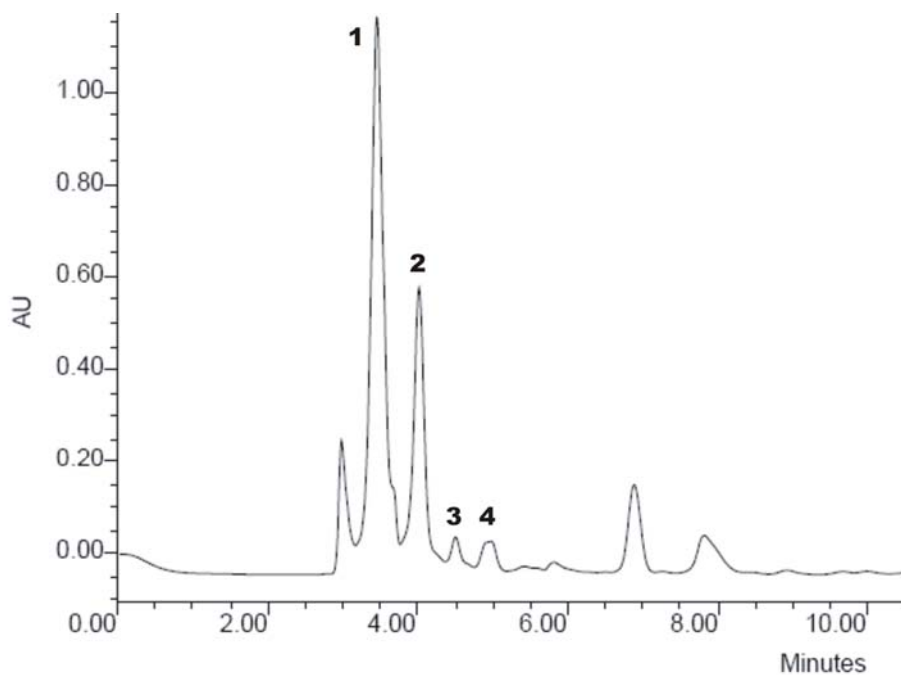
Obr. 9 *Chromatogram organických kyselin v moštu odrůdy Rulandské modré – spontánní kvašení (8.10.)*

Legenda:

1 – kyselina vinná, 2 – kyselina jablečná, 3 – kyselina mléčná, 4 – kyselina citrónová



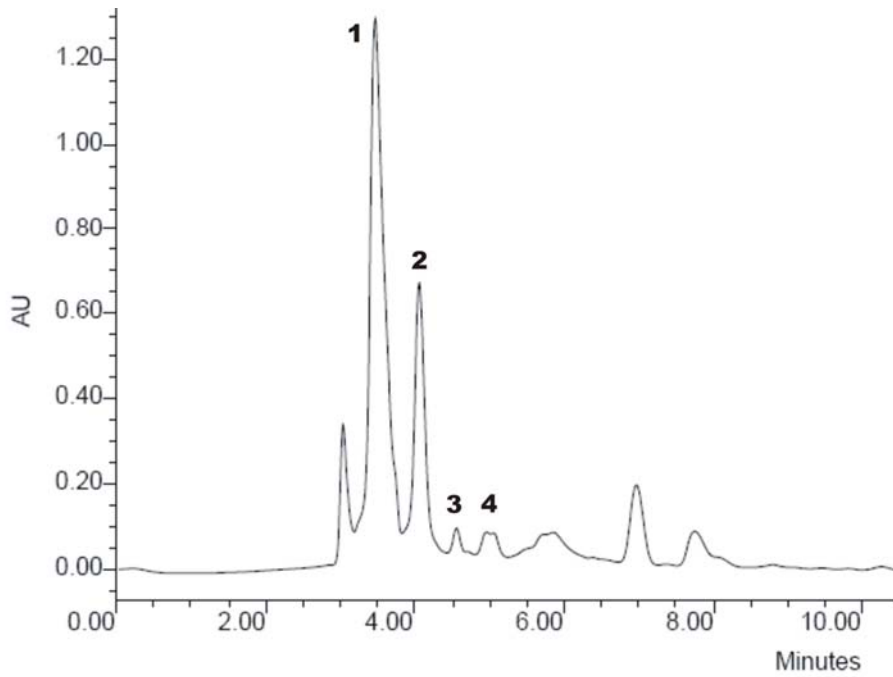
Obr. 10 Chromatogram organických kyselin v průběhu kvašení odrůdy Rulandské modré – spontánní kvašení (9.10.)



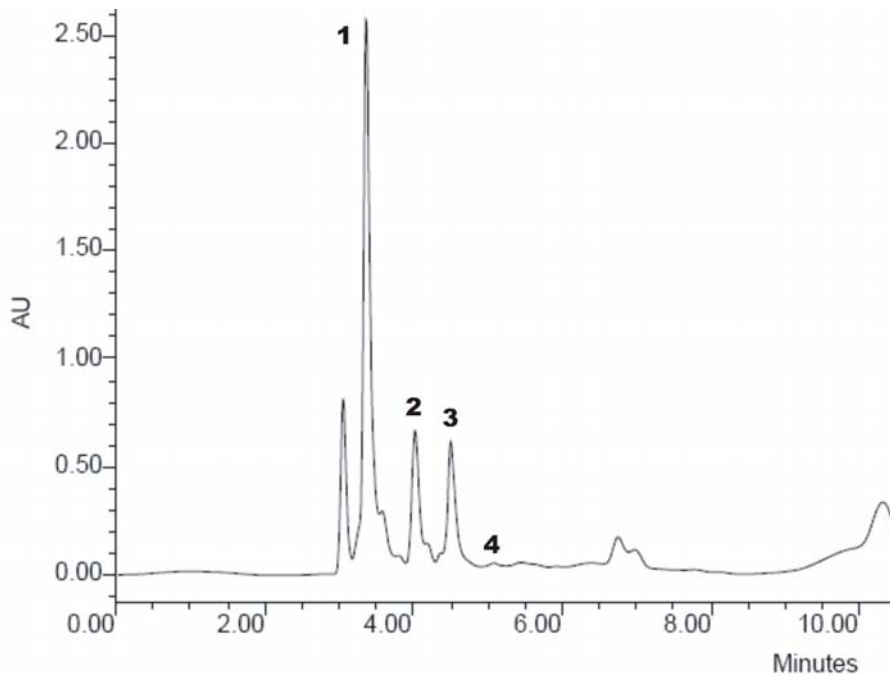
Obr. 11 Chromatogram organických kyselin v průběhu kvašení odrůdy Rulandské modré – spontánní kvašení (10.10.)

Legenda:

1 – kyselina vinná, 2 – kyselina jablečná, 3 – kyselina mléčná, 4 – kyselina citrónová



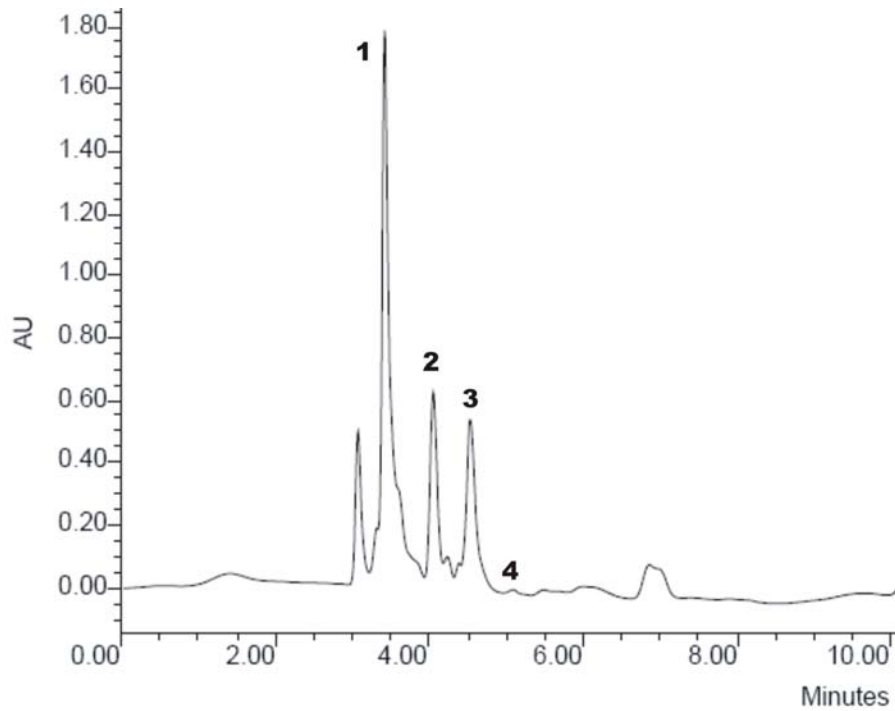
Obr. 12 *Chromatogram organických kyselin v průběhu kvašení odrůdy Rulandské modré – spontánní kvašení (11.10.)*



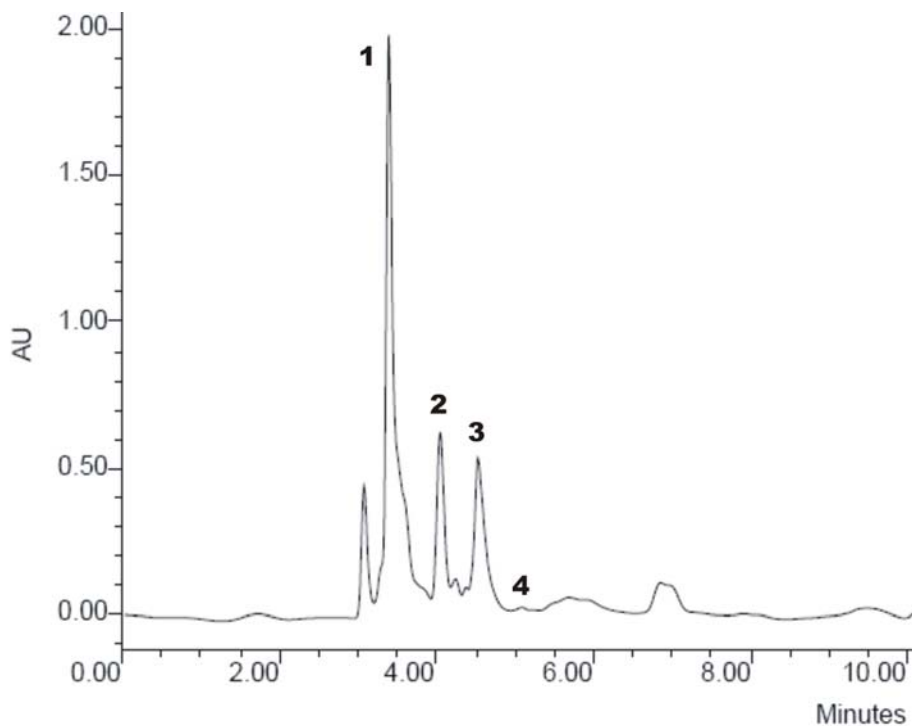
Obr. 13 *Chromatogram organických kyselin v průběhu kvašení odrůdy Rulandské modré – spontánní kvašení (15.10.)*

Legenda:

1 – kyselina vinná, 2 – kyselina jablečná, 3 – kyselina mléčná, 4 – kyselina citrónová



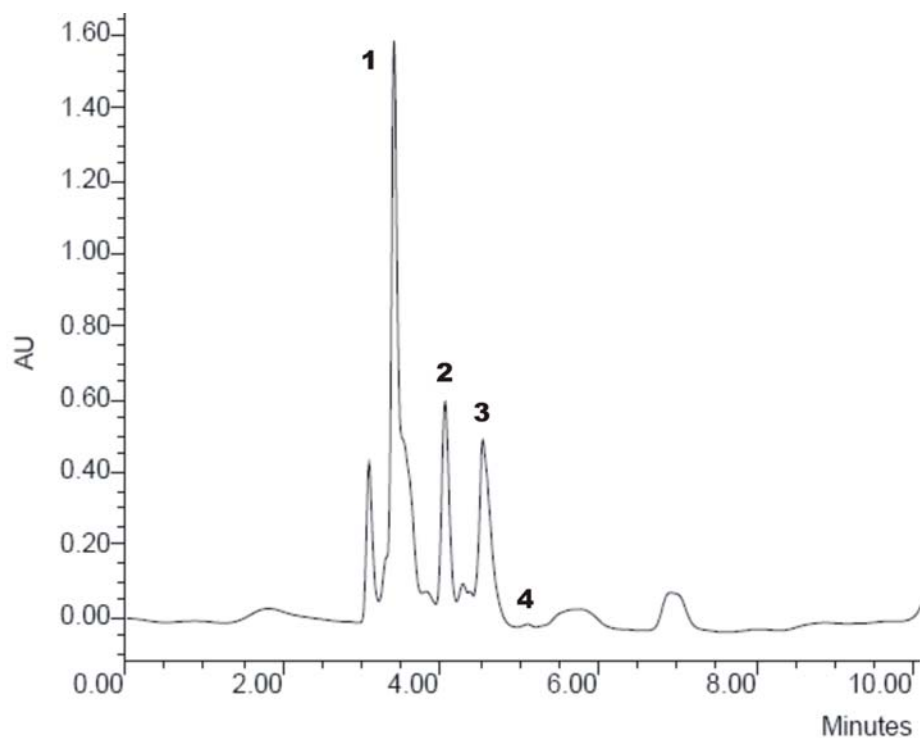
Obr. 14 Chromatogram organických kyselin v průběhu kvašení odrůdy Rulandské modré – spontánní kvašení (16.10.)



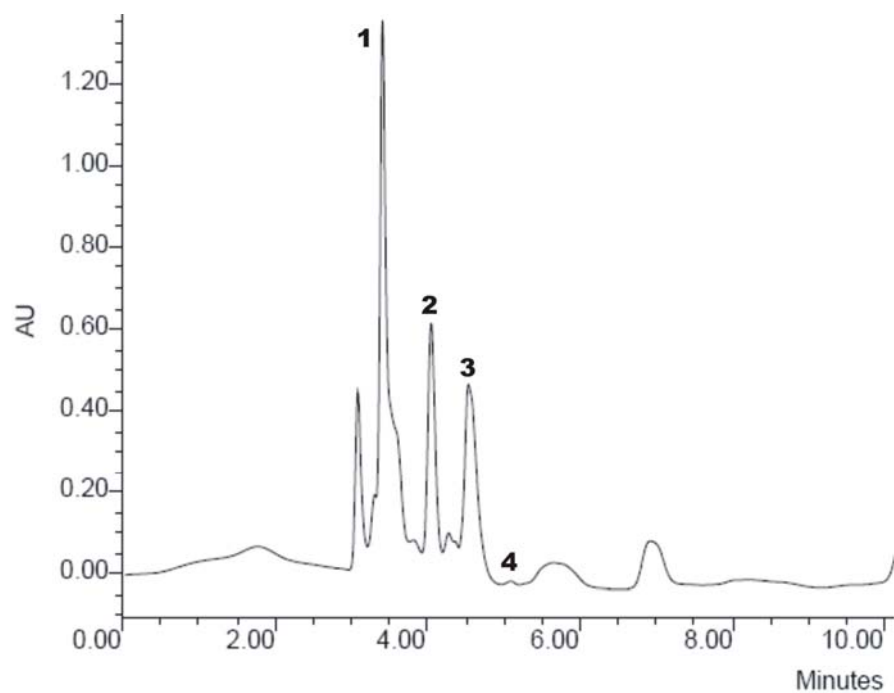
Obr. 15 Chromatogram organických kyselin v průběhu kvašení odrůdy Rulandské modré – spontánní kvašení (17.10.)

Legenda:

1 – kyselina vinná, 2 – kyselina jablečná, 3 – kyselina mléčná, 4 – kyselina citrónová



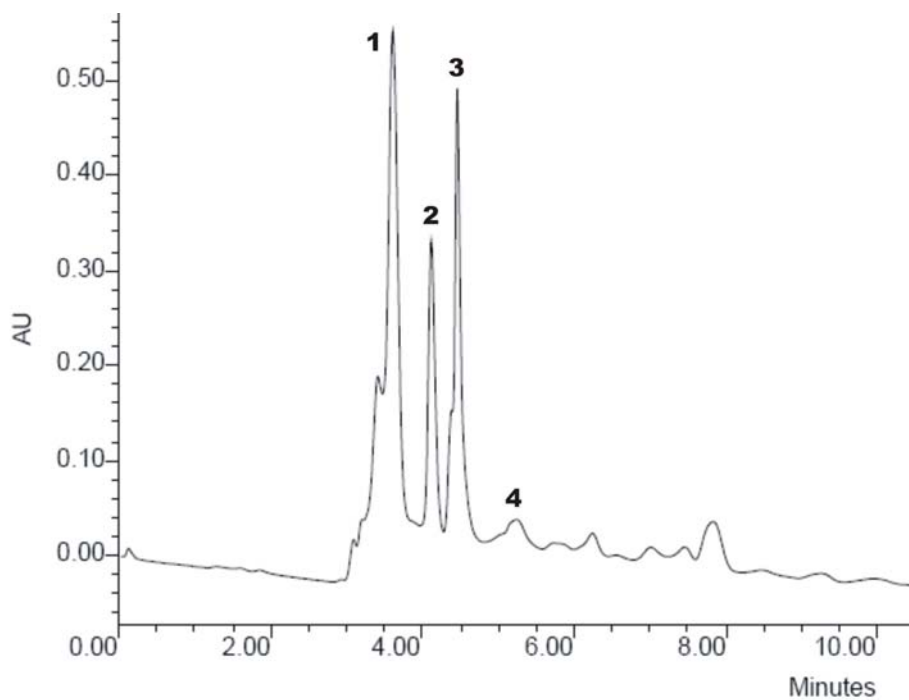
Obr. 16 Chromatogram organických kyselin v průběhu kvašení odrůdy Rulandské modré – spontánní kvašení (18.10.)



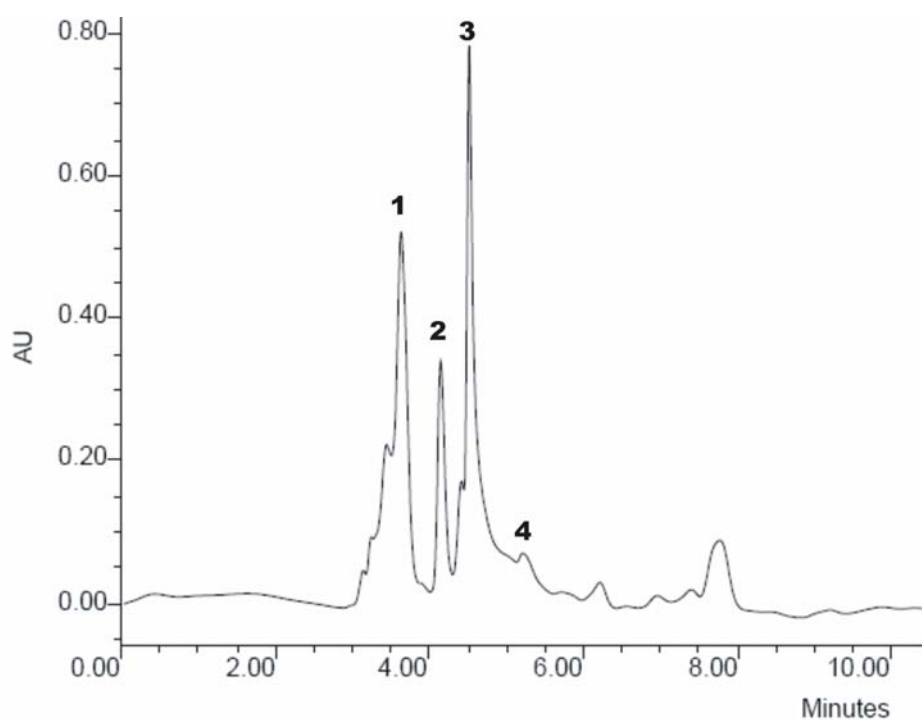
Obr. 17 Chromatogram organických kyselin v průběhu kvašení odrůdy Rulandské modré – spontánní kvašení (22.10.)

Legenda:

1 – kyselina vinná, 2 – kyselina jablečná, 3 – kyselina mléčná, 4 – kyselina citrónová



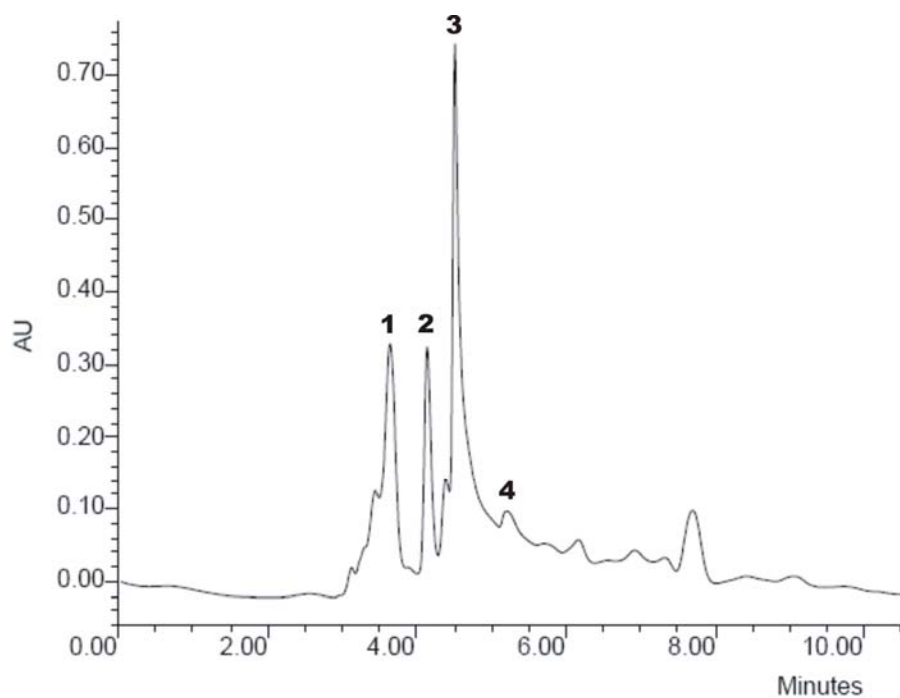
Obr. 18 Chromatogram organických kyselin v průběhu kvašení odrůdy Rulandské modré – spontánní kvašení (24.10.)



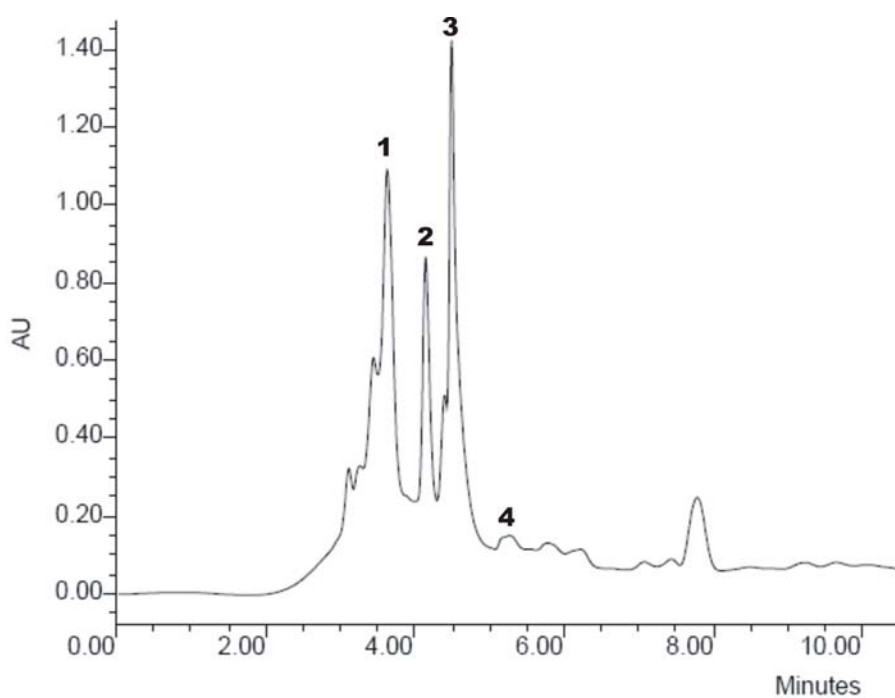
Obr. 19 Chromatogram organických kyselin v průběhu kvašení odrůdy Rulandské modré – řízené kvašení (11.10.)

Legenda:

1 – kyselina vinná, 2 – kyselina jablečná, 3 – kyselina mléčná, 4 – kyselina citrónová



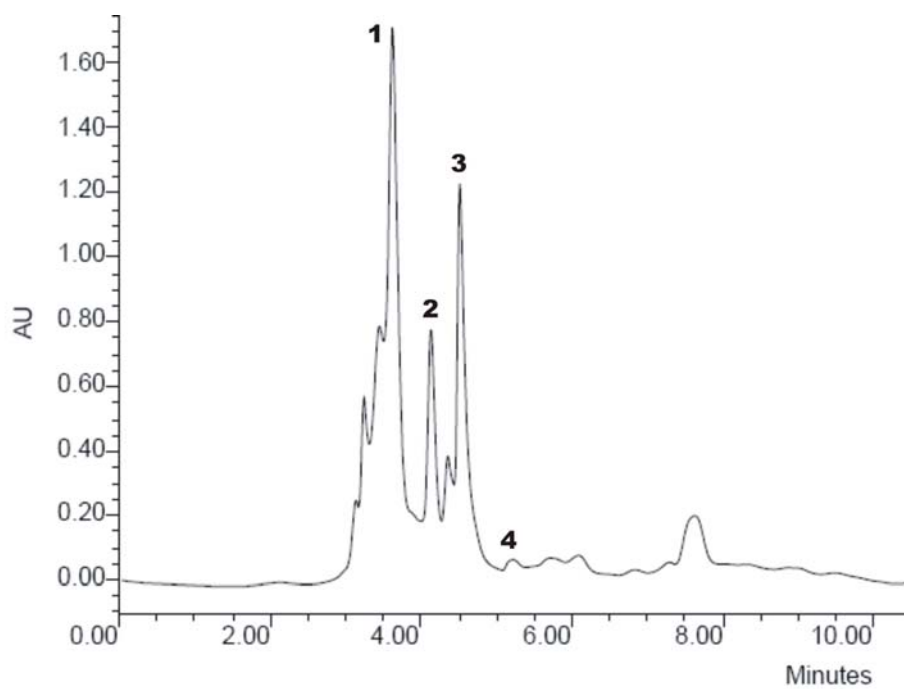
Obr. 20 Chromatogram organických kyselin v průběhu kvašení odrůdy Rulandské modré – spontánní kvašení (18.10.)



Obr. 21 Chromatogram organických kyselin v průběhu kvašení odrůdy Rulandské modré – řízené kvašení (22.10.)

Legenda:

1 – kyselina vinná, 2 – kyselina jablečná, 3 – kyselina mléčná, 4 – kyselina citrónová



Obr. 22 Chromatogram organických kyselin v průběhu kvašení odrůdy Rulandské modré – řízené kvašení (24.10.)

Legenda:

1 – kyselina vinná, 2 – kyselina jablečná, 3 – kyselina mléčná, 4 – kyselina citrónová

4.2 Srovnání obsahu organických kyselin u odrůdy Ruladské modré

4.2.1 Tabulky

Tabulka 1. Teplota a pH v době odběru vzorků při spontánním kvašení

Samovolné kvašení		
datum	teplota	pH
8.10.2007	20	3,2
9.10.2007	20	3,38
10.10.2007	23	3,38
11.10.2007	20	3,38
15.10.2007	22	3,67
16.10.2007	20	3,52
17.10.2007	20	3,54
18.10.2007	20	3,57
20.10.2007	15 - 18	neměřeno
22.10.2007	15 - 18	3,48
24.10.2007	15 - 18	3,51

Tabulka 2. Teplota a pH v době odběru vzorků při řízeném kvašení

Řízené kvašení		
datum	teplota	pH
11.10.2007	22	3,58
18.10.2007	21	3,57
20.10.2007	20	neměřeno
21.10.2007	20	neměřeno
22.10.2007	19	3,57
24.10.2007	19	3,59

Tabulka 3: Koncentrace vybraných kyselin při spontánním kvašení

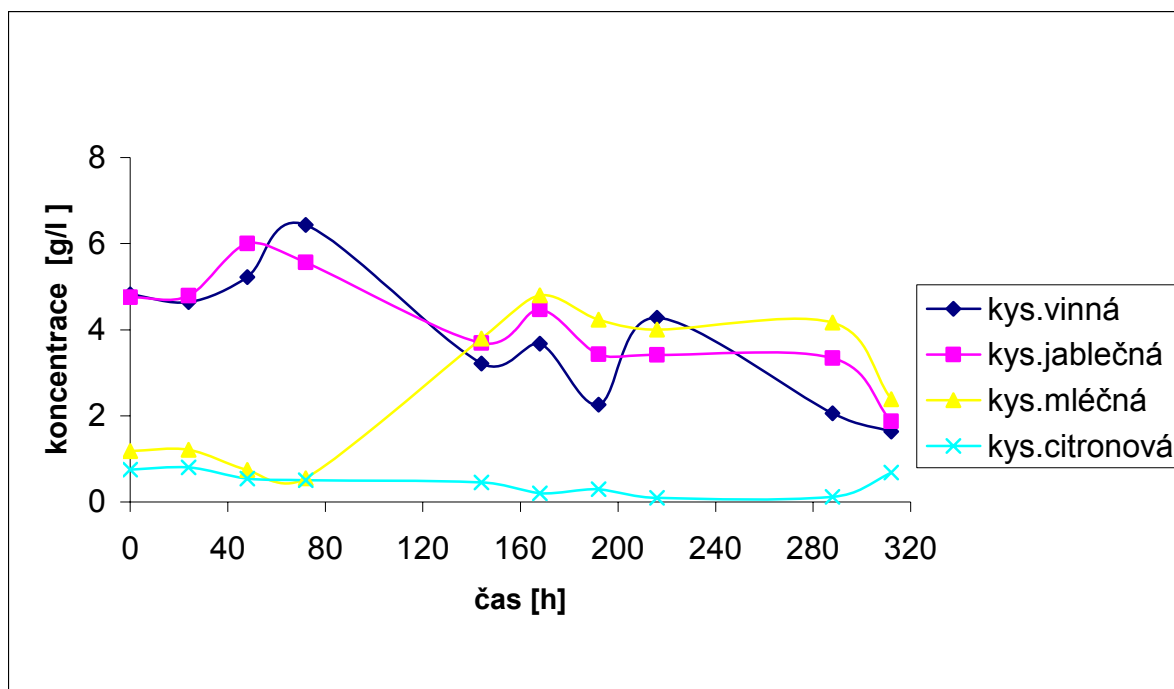
Datum	8.10.		9.10.		10.10.		11.10.		15.10.	
	\bar{x} [g/l]	S _R	\bar{x} [g/l]	S _R	\bar{x} [g/l]	S _R	\bar{x} [g/l]	S _R	\bar{x} [g/l]	S _R
kyselina vinná	4,82	0,14	4,64	0,12	5,22	0,02	6,43	0,31	3,22	0,25
kyselina jablečná	4,76	0,11	4,79	0,03	6,00	0,61	5,56	0,38	3,69	0,13
kyselina mléčná	1,18	0,03	1,21	0,06	0,74	0,06	0,55	0,02	3,80	0,2
kyselina citrónová	0,75	0,02	0,80	0,07	0,54	0,03	0,51	0,02	0,46	0,21

Datum	16.10.		17.10.		18.10.		22.10.		24.10.	
	\bar{x} [g/l]	S _R	\bar{x} [g/l]	S _R	\bar{x} [g/l]	S _R	\bar{x} [g/l]	S _R	\bar{x} [g/l]	S _R
kyselina vinná	3,68	0,01	2,56	0,14	4,28	0,64	2,06	0,1	1,63	0,17
kyselina jablečná	4,47	0,33	3,43	0,09	3,41	0,05	3,34	0,12	1,87	0,05
kyselina mléčná	4,80	0,82	4,24	0,10	4,01	0,07	4,16	0,16	2,38	0,09
kyselina citrónová	0,20	0,11	0,30	0,05	0,09	0,06	0,12	0,02	0,69	0,41

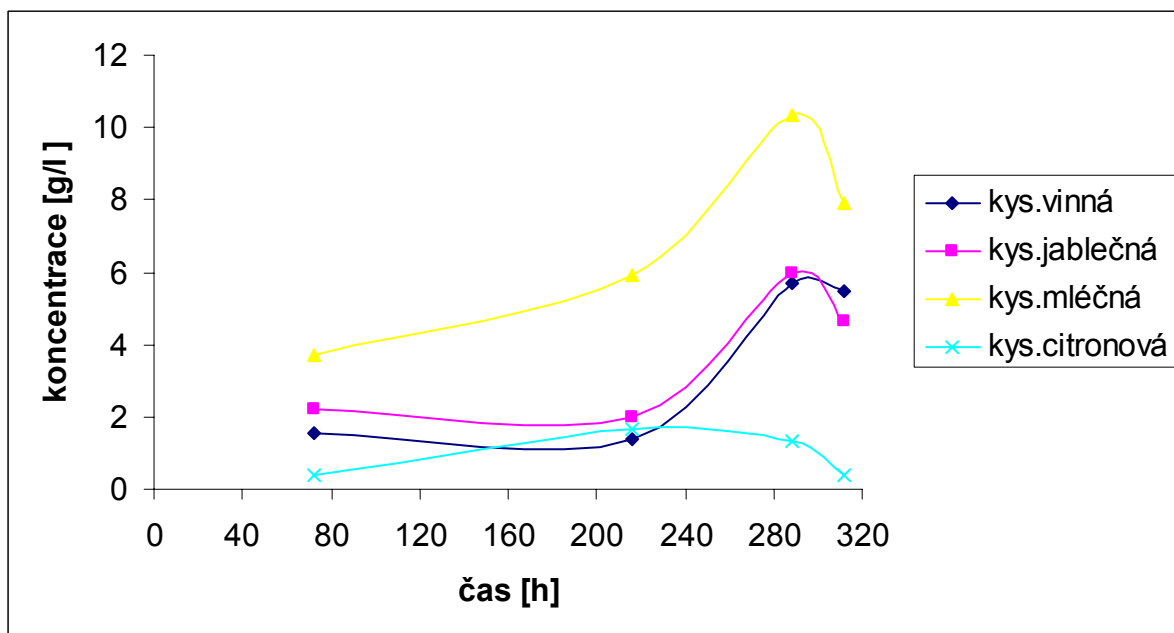
Tabulka 4: oncentrace vybraných kyselin při řízeném kvašení

Datum	11.10.		18.10.		22.10.		24.10.	
	\bar{x} [g/l]	S _R	\bar{x} [g/l]	S _R	\bar{x} [g/l]	S _R	\bar{x} [g/l]	S _R
kyselina vinná	1,55	0,04	1,36	0,06	5,69	0,54	5,48	0,8
kyselina jablečná	2,22	0,56	1,99	0,23	5,99	0,35	4,67	0,31
kyselina mléčná	3,72	0,63	5,92	0,47	10,32	0,6	7,90	0,24
kyselina citrónová	0,39	0,10	1,64	0,66	1,33	0,46	0,39	0,1

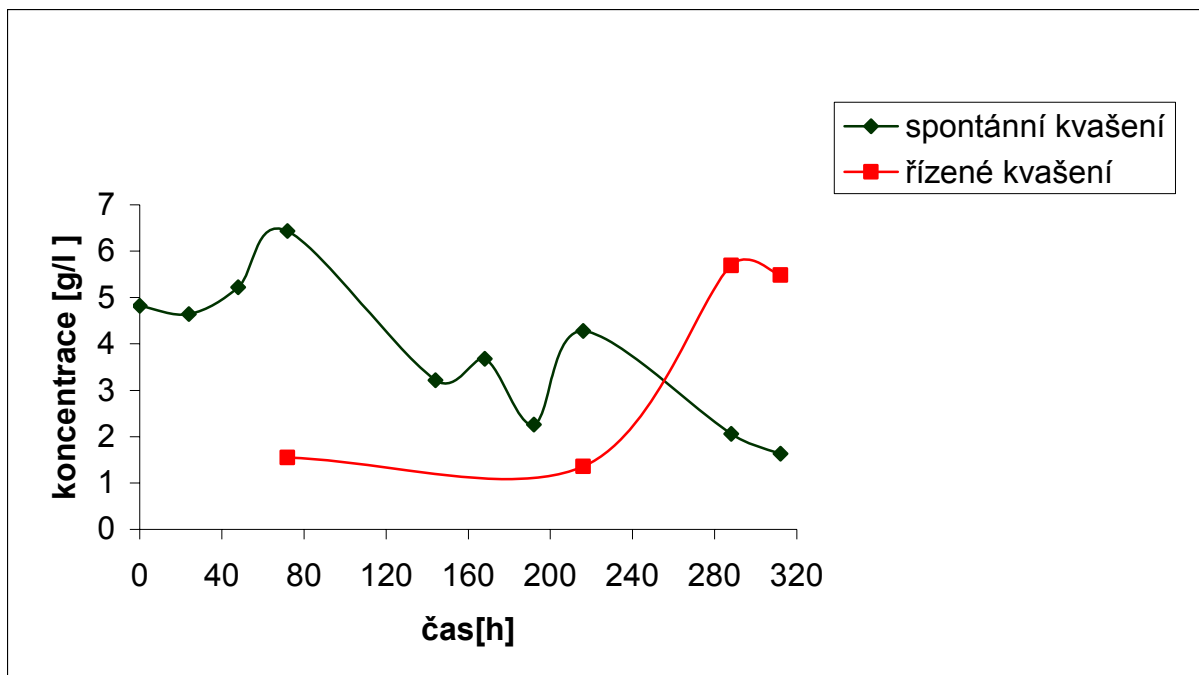
4.2.2 Časové závislosti



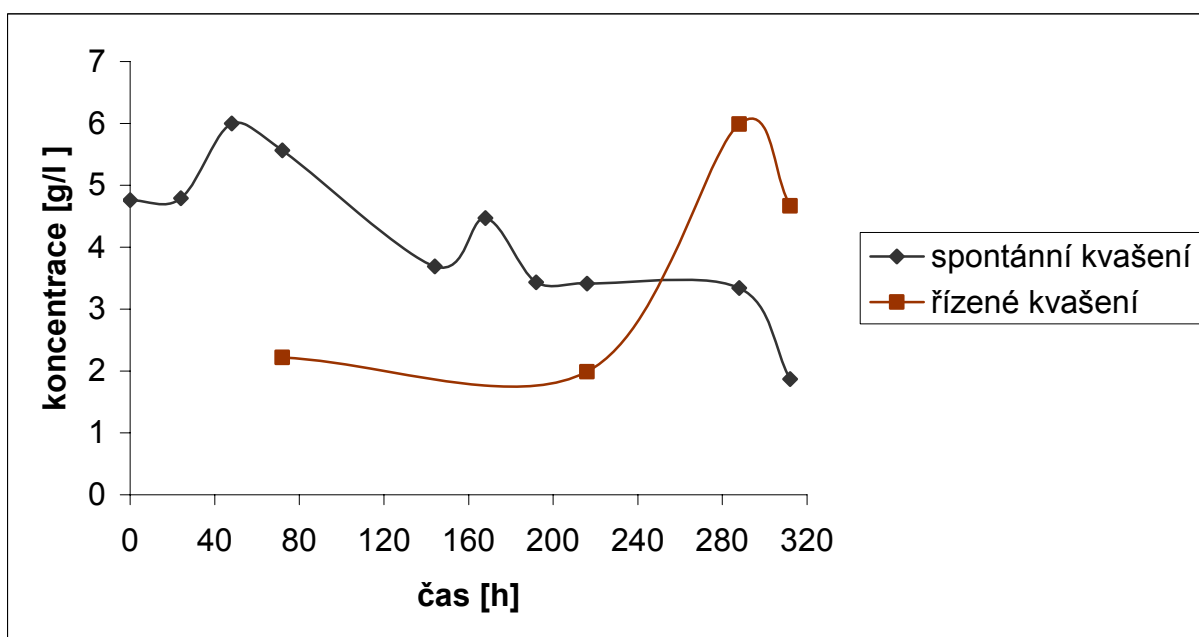
Obr. 23. Celkový obsah vybraných kyselin při spontánním kvašení



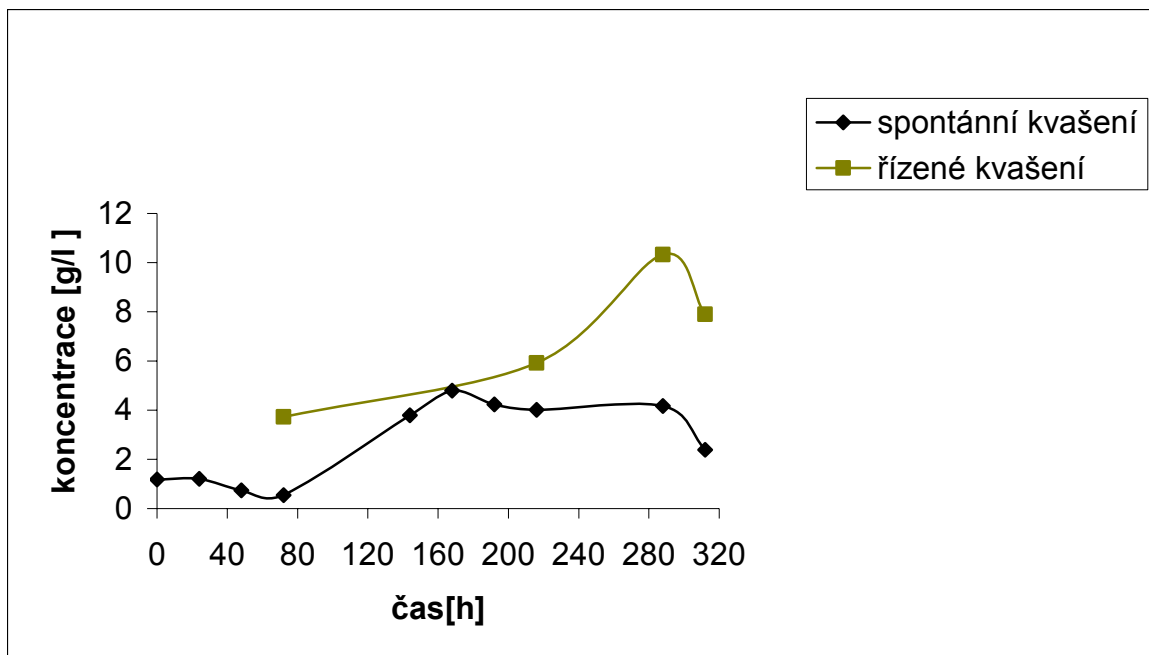
Obr. 24. Celkový obsah vybraných kyselin při řízeném kvašení



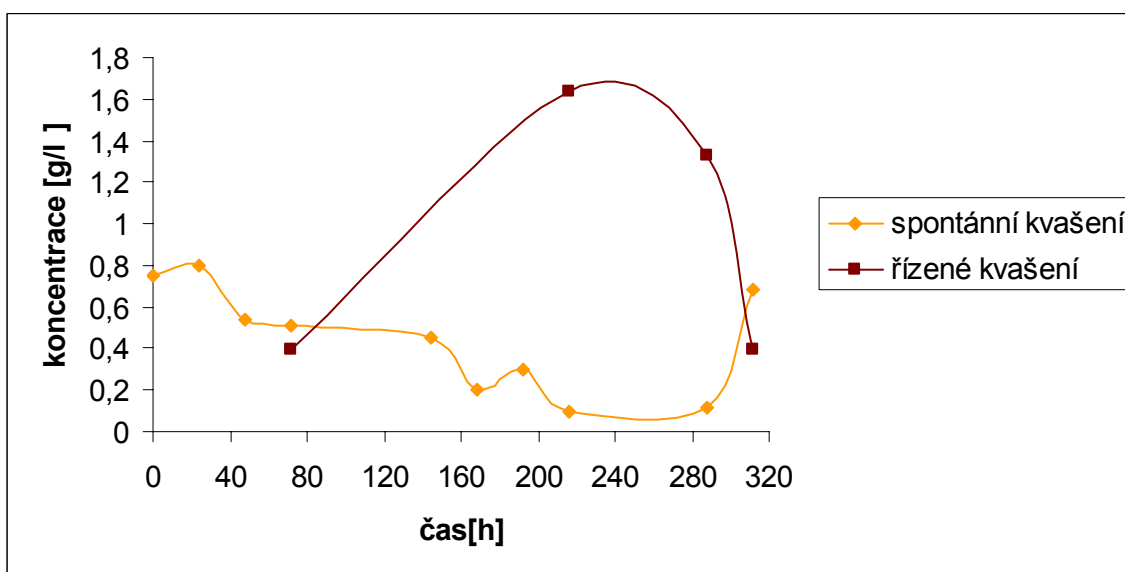
Obr. 25. Srovnání koncentrace kyseliny vinné v průběhu spontánního a řízeného kvašení.



Obr. 26. Srovnání koncentrace kyseliny jablečné v průběhu spontánního a řízeného kvašení



Obr. 27. Srovnání koncentrace kyseliny mléčné v průběhu spontánního a řízeného kvašení.



Obr. 28. Srovnání koncentrace kyseliny citronové v průběhu spontánního a řízeného kvašení

5 DISKUSE

V práci byly sledovány změny koncentrace kyseliny vinné, jablečné, mléčné a citronové v průběhu spontánního a řízeného kvašení u odrůdového vína Rulandské modré. Na začátku byl u obou kvašení přidán enzym (Rapidase Excolor, její složení: ektinaza, hemicellulaza) a u řízeného kvašení ještě kvasinky.

U kyseliny vinné (Obr.25) bylo při spontánním kvašení pozorováno mírné kolísání a ke konci procesu byl pozorován větší pokles až na hodnotu 1,63 g/l. To se neshoduje s literaturou [1], která uvádí, že hodnoty koncentrace kyseliny vinné jsou konstantní. Kolísání může být způsobeno různými biologickými procesy, které ovlivňují průběh kvašení. K velkému nárůstu koncentrace kyseliny vinné (5,69 g/l) dochází při řízeném kvašení ve 214. hodině, což je způsobeno přidáním bakterií.

Koncentrace kyseliny jablečné se pohybovala při spontánním kvašení v rozmezí od 1,87 do 6 g/l, v konečné fázi procesu klesla na hodnotu 1,87 g/l, což se shoduje s literaturou [1], která udává, že obsah kyseliny jablečné klesá během kvašení i po něm v důsledku biologického odbourávání kyselin. V průběhu řízeného kvašení byl zjištěn velký nárůst koncentrace kyseliny jablečné až na hodnotu 5,99 g/l a poté mírný pokles na hodnotu 4,67 g/l (Obr.26)

Grafický průběh změny koncentrace kyseliny mléčné je znázorněn na Obr.27. Byl pozorován velký nárůst koncentrace až na hodnotu 10,32 g/l při řízeném kvašení. Tato změna byla způsobena tím, že v průběhu kvašení nastala malolaktická fermentace, která se projevila nárůstem koncentrace kyseliny mléčné a poklesem koncentrace kyseliny jablečné [26]. Při spontánním kvašení koncentrace kyseliny mléčné vzrostla z hodnoty 0,55 g/l až na 4,8 g/l. Tento nárůst ale není tak intenzivní, neboť zde nebyly přidány bakterie.

Charakter průběhu změny koncentrace kyseliny mléčné, jablečné a vinné byl u řízeného kvašení obdobný, což bylo způsobeno přidáním bakterií 10. den, tj. v 214. hodině procesu, a řízením teploty.

U spontánního kvašení kyselina citrónová dosahovala nízkých koncentrací, hodnoty se pohybovaly od 0,9 do 0,8 g/l, což souhlasí s údaji v literatuře [25]. V průběhu řízeného kvašení došlo nejdříve k malému nárůstu koncentrace kyseliny citronové, a potom k pomalému poklesu až na 0,39 g/l. Grafické znázornění změny koncentrace této kyseliny je uvedeno na Obr. 28.

Nejvíce obsaženou kyselinou ve víně i v moštu je kyselina vinná, která v našich měřeních dosahovala koncentrace 4 až 6 g/l, což se shoduje s literaturou [18,26]. Druhou nejvíce obsaženou kyselinou ve víně je kyselina jablečná, což se rovněž shoduje s literaturou [18].

Čím více jsou vyzrálé hrozny, tím více je v hroznech a následně i ve víně zastoupena kyselina vinná a tím méně je zastoupena chuťově ostřejší kyselina jablečná. Naopak, v nevyzrálých ročnících je více ostřejší kyseliny jablečné a méně chuťově jemnější kyseliny vinné [39]. Toto tvrzení je patrné z grafického znázornění změn koncentrací jednotlivých kyselin při spontánním a řízeném kvašení, budeme – li posuzovat vyzrálost hroznů podle prvního odběru, tj. 72. hodina. Koncentrace kyseliny vinné je v případě řízeného kvašení (Obr. 24) nižší než koncentrace kyseliny jablečné, z čehož lze usoudit, že hrozny nebyly dostatečně vyzrálé. V případě spontánního kvašení je koncentrace kyseliny vinné vyšší než kyseliny jablečné, proto lze říci, že hrozny byly dostatečně vyzrálé (Obr. 23).

Jestliže má mošt a mladé víno vyšší obsah kyselin, není to překážka, protože obsah kyselin se v průběhu kvašení a zrání snižuje jablečno-mléčnou fermentací a vysrážením hydrogenvinanu

draselného.[7] Tento fakt lze potvrdit při spontánním kvašení v případě kyseliny vinné a jablečné, což je patrné z Obr. 23. Při jablečno-mléčném kvašení dochází k přeměně kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou a oxid uhličitý, jak dokazuje opět Obr. 23, kdy se zvyšuje hodnota koncentrace kyseliny mléčné oproti koncentraci kyseliny jablečné.

Při řízeném kvašení (Obr. 24) je koncentrace kyseliny mléčné mnohem vyšší v porovnání s koncentracemi ostatních kyselin. Kyselina mléčná nevzniká jenom při jablečno-mléčné fermentaci, ale vzniká již při kvašení, zvláště při vyšší teplotě. V tomto experimentu dosahovala teplota řízeného kvašení až 22 °C. Ke zvýšení koncentrace kyseliny mléčné přispívá i probíhající malolaktická fermentace, kdy dochází k přeměně kyseliny jablečné právě na kyselinu mléčnou. V literatuře [40] je uvedeno, že mléčné bakterie rozkládají kyselinu citrónovou na zmiňovanou kyselinu mléčnou, octovou a další produkty. Proto tyto bakterie přidané 10. den procesu také přispěly ke zvýšení koncentrace kyseliny mléčné.

Obsah kyseliny citrónové v moštu bývá jen cca 100 - 300 mg/l. V hroznech napadených ušlechtilou hnilobou a v ledových vínech může obsah kyseliny citrónové přesáhnout i 600 mg/l.[40] Koncentrace kyseliny citrónové v hroznech použitých v tomto experimentu (pocházely z Velkopavlovické oblasti) dosahovala hodnoty 750 mg/l při spontánním kvašení a 390 mg/l při řízeném kvašení. To potvrzuje fakt uvedený v literatuře [40], že hrozny z jižních oblastí mají větší obsah kyseliny citrónové. Vliv na množství této kyseliny má i odrůda vína.[40]

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo sledování vlivu řízeného a spontánního kvašení na obsah organických kyselin ve víně. Pozornost byla zaměřena především na kyselinu citrónovou, jablečnou, mléčnou a vinnou. Během experimentu se vycházelo především z podmínek uvedených v článku [41] a z materiálů o chromatografické koloně dodaných firmou Agilent Technologies. Stanovení koncentrace jednotlivých kyselin bylo provedeno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC s UV detekcí. Vzorek analyzovaného odrůdového vína Rulandské modré pocházel z velkopavlovické podoblasti.

V průběhu experimentu byly podmínky uvedené v článku [41] upraveny tak, aby analýza vzorků byla co nejpřesnější. Původní vlnová délka 210 nm byla zvýšena na 220 nm, při které bylo dosaženo vyšší citlivosti signálu. Průtok 1 ml/min byl snížen na hodnotu 0,5 ml/min, čímž byla zajištěna lepší separace jednotlivých organických kyselin. Teplota byla zvýšena z 25 °C na 45 °C, která opět podpořila lepší separaci jednotlivých kyselin. V důsledku těchto změn musela být délka analýzy prodloužena z 10 minut na 20 minut.

Vzorky nevyžadovaly žádnou speciální úpravu, byly pouze přefiltrovány přes mikrofiltr. Přefiltrování bylo nutné, aby se do stanovovaného vzorku nedostaly nečistoty, které jsou ve víně obsaženy vlivem procesu výroby a které by tak mohly poškodit zařízení chromatogramu.

Víno bylo zpracováno dvěma technologickými postupy a to spontánním a řízeným kvašením. Mezi jednotlivými procesy kvašení byl patrný rozdíl v obsahu organických kyselin.

Z naměřených dat lze usoudit, že při spontánním kvašení zjištěný průběh změny koncentrace kyseliny vinné neodpovídá údajům uvedených v literatuře. To je způsobeno biologickými procesy, které ovlivňovali průběh kvašení. Koncentrace kyseliny jablečné odpovídá závěrům uvedených v literatuře, kdy hodnota její koncentrace klesá. Tento pokles způsobuje malolaktická fermentace, při které dochází k přeměně kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou. Důsledkem této přeměny dochází ke zvýšení koncentrace kyseliny mléčné ve víně, což potvrzuje závěry z literatury. Z provedeného experimentu také vyplývá, že hodnota koncentrace kyseliny citrónové se v průběhu spontánního kvašení téměř nemění.

U řízeného kvašení byla koncentrace kyselin na počátku procesu téměř konstantní, po přidavku bakterií koncentrace kyseliny vinné, jablečné a mléčné intenzivně stoupala. Přidavek mléčných bakterií měl také vliv na změnu koncentrace kyseliny citrónové, ale na konci měření dosahovala koncentrace kyseliny citrónové stejných hodnot jako na počátku experimentu.

Hodnoty koncentrace kyseliny vinné získané při odběru vzorků zpracovaných postupem řízeného kvašení, neodpovídají údajům uvedených v literatuře, neboť koncentrace kyseliny vinné není konstantní. Z grafu závislosti koncentrace kyseliny jablečné na čase lze usoudit, že v konečné fázi procesu její koncentrace klesá, což odpovídá údajům v literatuře. Pokles je důsledkem malolaktické fermentace. Při procesu malolaktické fermentace také dochází ke zvýšení koncentrace kyseliny mléčné, která také odpovídá údajům uvedených v literatuře. Koncentrace kyseliny citrónové se také vlivem přidavku bakterií zvýšila, ale nakonec dosahovala stejných hodnot jako na začátku měření.

Jestliže srovnáme obsah organických kyselin při spontánním a řízeném kvašení lze říci, že ve víně zpracovaném způsobem řízeného kvašení je větší obsah sledovaných organických kyselin, a to celkový obsah, ale i obsah jednotlivých kyselin.

7 LITERATURA

- [1] Kraus, V., Kuttelvašer, Z., Vurm, B. *Encyklopedie českého a moravského vína*. 1. dotisk Praha: Knižní klub, 1997. 223 s. ISBN 80-7176-845-6.
- [2] Ševčík, L. *Hledání pravdy o víně – Červená vína*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, spol. s r.o., 1999. 144 s. + 4 s. přílohy. ISBN 80-7169-840-7
- [3] Ševčík, L. *Hledání pravdy o víně – Bílá vína*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, spol. s r.o., 1999. 144 s. + 4 s. přílohy. ISBN 80-7169-754-0
- [4] Kuttelvašer, Z. *Abeceda vína*. 2. vyd. Praha: Radix, 2003. 279 s. ISBN 80-86031-43-8.
- [5] Kraus, V., Kopeček, J. *Setkání s vínem*. 1. vyd. Praha: Radix, spol.s r.o., 2002. 142 s. ISBN 80-86031-36-5
- [6] Seidl, R. *Sklepní hospodářství*. 1. vyd. Valtice: Národní salon vín, 2002. 307 s. ISBN 80-903201-0-4.
- [7] Farkaš, J. *Všetko o víne*. Slovensko: Neografia, a.s., 1998. 171 s. ISBN 80-88892-16-3.
- [8] Drdák, M., Studnický, J., Márová, E., Karovičová, J. *Základy potravinářských technologií*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 1996. 512 s. ISBN 80-967064-1-1.
- [9] Pavloušek, P. *Výroba vína u malovinařů*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2006. 108 s. ISBN 80-247-1247-4.
- [10] Kraus, V., Konečný, A. *Základy výroby vína*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1958. 241 s.
- [11] Kraus, V., Hubáček, V., Ackermann, P. *Rukověť vinaře*. Praha: ČZS – nakladatelství KVĚT a Nakladatelství Brázda s.r.o, 2002. 257 s. ISBN80-85362-34-1 a ISBN 80-209-0286-4.
- [12] Kraus, V., Foffová, Z., Vurm, B., Krausová, D. *Nová ENCYKLOPEDIIE českého a moravského VÍNA*. Praha: Praga Mystica, 2005. 306 s. ISBN 80-86767-00-0
- [13] Redakce, Vinařská komora, o.p.s.: *Přehled kyselin vína* [online]. 2002, poslední revize 8. 11. 2003, Dostupné z:<<http://www.vinoteky.cz/vinkom/shop.nsf/TDoc/B3083A01745CB8FE88256B840035069F>>
- [14] Kordin-Krapež, M., Abram, V., Kač, M., Ferjančič, S. *Determination of Organic Acids in White Wines by RP-HPLC*. Food Science and Technology, 2001. vol. 39, no. 2, pp. 93-99. ISSN 1330-9862.
- [15] Llorente, M., Villarroya, B., Gómez-Cordovés, C. *Reverse-Phase HPLC of Organic Acids in Musts*. Chromatografia, 1991. vol. 32, no. 11/12, pp. 555-558.
- [16] Dopico-García, M.S., Valentão, P., Guerra, L., Andrade, P.B., Seabra, R.M. *Experimental design for extraction and quantification of phenolic compounds and organic acids in white „Vinho Verde“ grapes*. Analytica Chimica Acta, 2007. vol. 583, pp. 15-22.
- [17] Mato, I., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J., Sancho, M. T. *Simultaneous determination of organic acids in beverages by capillary zone electrophoresis*. Analytica Chimica Acta, 2006. vol. 565, pp. 190-197.
- [18] Mato, I., Suárez-Luque, S., Huidobro, J. F. *A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines*. Food Research International, 2005. vol. 38, pp.1175-1188.
- [19] Mato, I.,Suárez-Luque, S., Huidobro, J. F. *Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection*. Food Chemistry, 2007. vol. 102, pp. 104-112.

- [20] Valentão, P., Seabra, R. M., Lopes, G., Silva, L. R., Martins, V., Trujillo, M. E., Velázquez, E., Andrade, P. B. *Influence of Dekkera bruxellensis on the contents of anthocyanins, organic acids and volatile phenols of Dão red wine*. Food Chemistry, 2007. vol. 100, pp. 64-70.
- [21] Ding, Ming-Yu, Koizumi, H., Suzuki, Y. *Comparison of Three Chromatographic Systems for Determination of Organic Acids in Wine*. Analytical science, 1995. vol. 11, pp. 239-243.
- [22] Kerem, Z., Bravdo, Ben-ami, Shoseyov, O., Tugendhaft, Y. *Rapid liquid chromatography-ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must*. Journal of Chromatography A, 2004. vol. 1052, pp.211-215.
- [23] Chinnici, F., Spinabelli, U., Amati, A. *Simultaneous determination of organic acids, sugars, and alcohols in musts and wines by an improved ion-exclusion HPLC Method*. Journal of liquid chromatography & related technologies, 2002. vol. 25, no. 16, pp. 2551-2560.
- [24] de Villiers, A., Lynen, F., Crouch, A., Sandra, P. *Development of a Solid-Phase Extraction Procedure for the Simultaneous Determination of Polyphenols, Organic Acids and Sugar in Wine*. Chromatographia, 2004. vol. 59, no. 7/8, pp. 403-409.
- [25] Stávek, V. *Vinařský obzor. Organické kyseliny v hroznech a moštu I.*, 2007; roč. 100, č. 9, pp. 560.
- [26] Morales, M. L., Gonzales, A.G., Troncoso, A. M. *Ion-exclusion chromatographic determination of organic acids in vinegars*. Journal of Chromatography A, 1998. vol. 822, pp. 45-51.
- [27] Soufleros, E. H., Bouloumpasi, E., Zotou, A., Loukou, Z. *Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration*. Food Chemistry, 2007. vol. 101, pp. 704-716.
- [28] Stávek, V. *Vinařský obzor. Organické kyseliny v hroznech a moštu II.*, 2007; roč. 100, č. 10, pp. 570.
- [29] Stávek, V. *Vinařský obzor. Organické kyseliny vín ročníku 2007.*, 2007; roč. 100, č. 11, pp. 573.
- [30] Escobal, A., Gonzales, J., Iriando, C., Laborra, C. *Liquid chromatographic determination of organic acids in txakoli from Bizkaia*. Food Chemistry, 1997. vol. 58, no. 4, pp. 381-384.
- [31] Mardones, C., Hitschfeld, A., Contreras, A., Lepe, K., Gutiérrez, L., von Baer, D. *Comparison of shikimic acid determination by capillary zone electrophoresis with direct and indirect detection with liquid chromatography for varietal differentiation of red wines*. Journal of Chromatography A, 2005. vol. 1085, pp. 285-292.
- [32] Castellari, M., Versari, A., Spinabelli, U., Galassi, S., Amati, A. *An improved HPLC method for the analysis of organic acids, carbohydrates, and alcohols in grape musts and wines*. Journal of liquid chromatography & related technologies, 2000. vol. 23, pp. 2047-2056.
- [33] Vérette, E., Qian, F., Mangani, F. *On-line dialysis with high-performance liquid chromatography for the automated preparation and analysis of sugars and organic acids in foods and beverages*. Journal of Chromatography A, 1995. vol. 705, pp. 195-203.
- [34] Linget, C., Netter, C., Heems, D., Vérette, E. *On-line dialysis with high-performance liquid chromatography for the automated preparation and analysis of amino acids, sugars, organic acids in grape juice and wine*. Analysis, 1998. vol. 26, pp.35-39.

- [35] Casella, G., Gatta, M. *Determination of Aliphatic Organic Acids by High Performance Liquid Chromatography with Pulsed Electrochemical Detection*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. vol. 50, pp.23-28.
- [36] Ding, M., Koizumi, H., Suzuki, Y. *Comparison of Three Chromatographic Systems for Determination of Organic Acids in Wine*. Analytical sciences, 1995. vol. 11, pp. 239-243.
- [37] Churáček, J a kol. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. Academia, 1.vydání Praha 1993. 387 s. ISBN 80-200-0010-0.
- [38] Coufal, P. *High performance liquid chromatography, HPLC* [on-line].
Poslední revize 2004-07-28 [citováno 2008-11-20].
Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>.
- [39] Moškvan, V.:Znovín Znojmo, a.s.,2005 – 2008 [on-line]. [citováno 2008-11-20].
Dostupné z: <http://www.znovin.cz/article.asp?nDepartmentID=161 &nArticleID=49 &nLanguageID=1>.
- [40] Krška, P.,Ptáček, L.:Svaz vinařů České republiky&Národní vinařské centrum,o.p.s.,2005 [on-line]. [citováno 2008-11-20]. Dostupné z: <http://www.wineofczechrepublic.cz/menu7-o-strankach-cz.html>.
- [41] Claessens, H.A., van Straten, M.A. *Analysis of Organic Acids in Aqueous Samples*. Agilent Technologies, 2004. pp.1-8

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

NADH	nikotinamidadeninukleotid
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CZE	kapilární zónová elektroforéza
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
GC	plynová chromatografie
TMS	trimethylsilylové deriváty
TBDMS	tercbutyldimethylsilyl
FID	ionizační plamenový detektor
MS	hmotnostní spektrometr
SPE	extrakce na tuhé fázi
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
IE-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s iontově výměnnými fázemi
BTA	benzentrikarboxylová kyselina
PAB	4-aminobenzoová kyselina
PDC	pyridindikarboxylová kyselina
PMA	pyromellitová kyselina
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
EDTA	ethylendiamintetrakarboxylová kyselina
MTAB	myristyltrimethylammonium bromid
TIAB	tetradecyltrimethylammonium bromid
TTAOH	tetradecyltrimethylammonium bromid
BGE	základní elektrolyt
IC	iontová chromatografie