

**Mendelova univerzita v Brně**  
**Zahradnická fakulta v Lednici**

**KOMPLEMENTÁRNÍ METODY K DÁVKOVÁNÍ**  
**OXIDU SIŘIČITÉHO**

**Bakalářská práce**

Vedoucí bakalářské práce  
doc. Ing. Mojmír Baroň, Ph.D.

Vypracoval  
Tomáš Franta

Loděnice 2015

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci: *Komplementární metody k dávkování oxidu siřičitého* vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

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

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

V Lednici dne:

.....

podpis

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Zpracovatel : **Tomáš Franta**  
Studijní program: Zahradnické inženýrství  
Obor: Vinohradnictví a vinařství  
Název tématu: **Komplementární metody k dávkování oxidu siřičitého**  
Rozsah práce: 35-40

Zásady pro vypracování:

1. Prostudujte literaturu pojednávající o oxidu siřičitém.
2. Uveďte zdravotní rizika a možné alergické reakce na oxid siřičitý. Rozdělte a shrňte metody snižování dávky oxidu siřičitého v technologii vín.
3. Uveďte, které uvedené metody se jeví jako perspektivní a proč.


Seznam odborné literatury:

1. BRANCO, J M. – RIBÉREAU-GAYON, P. Handbook of enology. : The chemistry of wine stabilization and treatments. volume 2. Chichester, West Sussex, England. 2006. ISBN 97804700103962, 97804700103722. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/0470010398>.
2. RIBÉREAU-GAYON, P. – BRANCO, J M. Handbook of enology. : The microbiology of wine and vinifications. volume 1. Chichester, West Sussex, England. 2006. ISBN 97804700103651, 97804700103411. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/0470010363>.
3. CLARKE, R J. – BAKKER, J. *Wine flavour chemistry*. 1. vyd. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2004. 324 s. ISBN 1-405-10530-5.
4. POLO, C M. – MORENO-ARRIBAS, V M. *Wine chemistry and biochemistry*. 1. vyd. New York: Springer, 2008. 735 s. ISBN 978-0-387-74116-1.

Datum zadání bakalářské práce: listopad 2013


Termín odevzdání bakalářské práce: květen 2015

L. S.

  
**Tomáš Franta**  
Autor práce



  
**Ing. Mojmír Baroň, Ph.D.**  
Vedoucí práce

  
**Ing. Mojmír Baroň, Ph.D.**  
Vedoucí ústavu

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

# OBSAH

1. ÚVOD.....	- 7 -
2. CÍL PRÁCE .....	- 9 -
3. SOUČASNÝ STAV POZNATKŮ .....	- 10 -
3.1 Oxid siřičitý .....	- 10 -
3.1.1 Chemismus oxidu siřičitého .....	- 10 -
3.1.2 Funkce oxidu siřičitého ve víně .....	- 12 -
3.1.3 Dávkování oxidu siřičitého.....	- 14 -
3.1.4 Zdravotní hledisko oxidu siřičitého .....	- 14 -
3.2 Technologické metody snížení potřeby SO <sub>2</sub> .....	- 15 -
3.2.1 Jablečno-mléčné kvašení .....	- 15 -
3.2.2 Technologie sur-lie .....	- 18 -
3.2.3 Tangenciální filtrace .....	- 19 -
3.3 Fyzikální metody snížení potřeby SO <sub>2</sub> .....	- 20 -
3.3.1 Pasterace .....	- 20 -
3.3.2 Ultrafialové záření.....	- 20 -
3.3.3 Ultrazvuk .....	- 21 -
3.3.4 Pulzní elektrické pole .....	- 22 -
3.3.5 Vysoký hydrostatický tlak .....	- 22 -
3.3.6 Světelné pulzy .....	- 23 -
3.3.7 Ohmické zahřívání .....	- 24 -
3.4 Chemické metody snížení potřeby SO <sub>2</sub> .....	- 24 -
3.4.1 Použití inertních plynů .....	- 24 -
3.4.2 Kyselina askorbová .....	- 25 -
3.4.3 Kyselina sorbová.....	- 26 -
3.4.4 Mastné kyseliny .....	- 28 -
3.4.5 Lysozym .....	- 29 -
3.4.6 Nisin .....	- 30 -
3.4.7 Dimetyldikarbonát .....	- 30 -
3.4.8 Natamycin.....	- 32 -
3.4.9 Koloidní stříbro .....	- 33 -
4. DISKUSE.....	- 34 -
5. ZÁVĚR .....	- 36 -
6. SOUHRN a RESUME .....	- 37 -
7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY .....	- 38 -
8. PŘÍLOHY .....	- 40 -
8.1 Obrázky .....	- 40 -
8.2 Seznam použitých zkratk .....	- 42 -

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Obecné rovnice vazby hydrogensířičitanu na složky vína.....	- 11 -
Obr. 2 Formy oxidu siřičitého ve víně.....	- 12 -
Obr. 3 Reakce malolaktické fermentace, reaktant kyselina L-jablečná, produkty kyselina L- mléčná a oxid uhličitý.....	- 16 -
Obr. 4 Reakce kyseliny askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou, vodíkové kationty a elektrony .....	- 26 -
Obr. 5 Hydrolyza dimetyldikarbonátu za vzniku metanolu a oxidu uhličitého .....	- 31 -
Obr. 6 Vzorec kyseliny L-jablečné (2-hydroxybutandiové) .....	- 40 -
Obr. 7 Vzorec kyseliny L-mléčné (2-hydroxypropanové).....	- 40 -
Obr. 8 Obrázek bakterie <i>Oenococcus oeni</i> .....	- 40 -
Obr. 9 Vzorec kyseliny askorbové .....	- 41 -
Obr. 10 Reakce kyseliny askorbové s kyslíkem na kyselinu dehydroaskorbovou a peroxid vodíku .....	- 41 -
Obr. 11 Vzorec kyseliny sorbové .....	- 41 -
Obr. 12 Vzorec <i>trans-trans</i> izomeru kyseliny sorbové .....	- 41 -
Obr. 13 Vzorec sorbátu draselného .....	- 41 -
Obr. 14 Vzorec dimetyldikarbonátu .....	- 42 -

# 1. ÚVOD

Tradice používání enologických přípravků určených ke konzervaci vína sahá do dávné historie. Nejstarší nálezy, vypovídající o výrobě vína, pocházejí z oblasti Gruzie a jsou staré asi 8 – 10 tisíc let. Některé zdroje uvádějí nálezy z oblasti dnešního Iránu staré 8 tisíc let. Nálezy nám dokladují, že na počátcích výroby vína se ke zlepšení chuťových vlastností a uchování používala pryskyřice a výluhy z rostlin. V současné době se pryskyřice stále aplikuje u speciálního řeckého vína nazývaného retsina.

Antiseptické vlastnosti sirných sloučenin jsou známé již od starověku. Archeologické nálezy ukazují, že se již kolem roku 700 př. n. l. v oblasti Arménie užívala síra ke konzervaci. Homér (800 př. n. l.) a Kato Starší (234 – 149 př. n. l.) uvádějí použití síry při vinifikaci. K uchování vína v amforách a konzervaci nádob se užívala sádra, pryskyřice a byliny, v případě používání sudů se osvědčilo pálení sirných knotů. V místech, kde se víno netransportovalo na lodích, ale na vozech a koních se časem upustilo od užívání křehkých a snadno rozbitelných nádob z keramiky a začaly se užívat dřevěné sudy. Dřevěné sudy byly původně používány Galy jako nádoby na uchování a transport piva, avšak později se v nich začalo převážet právě víno. V teplém počasí se však víno snadno kazilo, mělo četné vady, napadaly ho octové bakterie a křís. Z tohoto důvodu se sudy používaly pouze jednorázově, jelikož při opětovném užívání docházelo k namnožení octových bakterií, jimiž byl sud kontaminován. Na druhou stranu, díky příhodám, které vznikaly křísováním vína, se vyvinula dodnes cíleně vyráběná žlutá jurská vína.

Staletí klimatického oteplování, která zaznamenala Evropa do 13. století, posunula pásmo pěstování révy vinné do severnějších částí kontinentu na území dnešní Anglie a Belgie. Tato teplá období přinesla potřebu používání značných dávek síry, k udržení přijatelného zdravotního stavu vína. Používání jiných enologických přípravků bylo limitováno křesťanským pohledem na problematiku, který aplikaci bylin, minerálů a smolení považoval za pohanský přežitek, a tak jediným přijatelným ošetřením vína bylo síření. V období 9. až 13. století, důsledkem klimatického oteplování, byla produkována vína s nízkými kyselinami, kde notné dávky síry nebyly v chuti příliš znatelné.

Od 14. století docházelo v Evropě ke klimatickému ochlazení, což mělo za následek nárůst acidity vín, a následkem toho se projevila agresivita siřičitanů v chuti.

V patnáctém století bylo vydáno mnoho výnosů zakazujících šíření, avšak nebyly dodržovány. V tehdejší době neexistovala metoda na stanovení obsahu siřičitanů. Od roku 1487 byl v platnosti dekret povolující používání síry ve vinařství, v němž byly specifikovány dávky a způsob aplikace.

V období od 15. století se v boji proti zvrhávání vína a jiným chorobám začal používat octan olovnatý. K vylepšení naoctěných vín se užíval oxid olovnatý, který snižoval aciditu a zvyšoval sladkou chuť. Používání klejtu (oxidu olovnatého) mělo za následek rozsáhlé zdravotní problémy v populaci, mnohdy končící i úmrtím, které vyústily vydáním nařízení zakazujícím jejich přidávání pod trestem smrti. Koncem 17. století byla prezentována metoda na stanovení obsahu olova ve víně.

Oxid olovnatý (PbO) reagující s kyselinou octovou vytváří octan olovnatý, který má nasládlou chuť. Účinek má proto dvě funkce, kterými jsou snížení obsahu kyseliny octové a zvýšení sladkosti vína.

V 19. století nastává klimatické oteplování, které má za následek snížení přílišné acidity. Od používání olova se upouští a v roce 1863 je navrhována metoda filtrace přes porézní látku jako jedna z metod ošetření vína před mikroorganismy. Devatenácté století taktéž přináší zákonné předpisy omezující maximální množství oxidu siřičitého ve víně. V polovině 20. století byla prokázána specifická účinnost molekulárního oxidu siřičitého.

Historie používání oxidu siřičitého je dlouhá asi tisíc šest set let, avšak tomuto způsobu ošetření vína a nádob předcházelo několik tisíc let bez síry s odlišnými enologickými postupy (Michlovský, 2012).



## **2. CÍL PRÁCE**

Cílem mé práce je zpracování dostupných informací ze zdrojů zahraniční i tuzemské literatury pojednávající o oxidu siřičitém ve víně, jeho funkci a účincích na lidské zdraví. Dále si práce klade za cíl nalezení komplementárních metod ošetření vína bez síření či s nepatrným užitím oxidu siřičitého, avšak bez dopadu na kvalitu vína.

### 3. SOUČASNÝ STAV POZNATKŮ

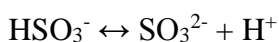
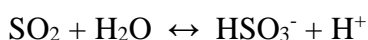
#### 3.1 Oxid siřičitý

Oxid siřičitý je bezbarvý jedovatý plyn s dusivým zápachem (Greenwood *et al.*, 1993). Oxid siřičitý lze vyjádřit sumárním chemickým vzorcem SO<sub>2</sub>. Jeho molekula je lomená, s vazebným úhlem O-S-O 119° a délkou dvojně vazby 143,1 pm (Greenwood *et al.*, 1993).

Oxid siřičitý má ve vztahu k ošetření vína čtyři základní funkce. Těmito funkcemi jsou antiseptická, antioxidační, antioxidantivní a antialdehydická (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006). O jednotlivých ochranných účincích bude pojednáváno následně. V souvislosti s formou výskytu či vázanosti oxidu siřičitého na víno můžeme hovořit o volném, vázaném a celkovém oxidu siřičitém.

##### 3.1.1 Chemismus oxidu siřičitého

**Volný oxid siřičitý** – Jedná se o anion kyselého siřičitanu (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Je tedy ve formě plně ionizovaných solí (Baroň, 2013a). Rozpouštění SO<sub>2</sub> ve vodném roztoku probíhá ve dvou krocích, ovlivňujícím faktorem je pH roztoku. Proces je možné popsat následujícími rovnicemi:



Reakce disociace kyselého hydrogensiřičitanu na siřičitan ve víně vzhledem k pH téměř neprobíhá (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006). Volný SO<sub>2</sub> je užitečný zejména svou antioxidační kapacitou, naproti tomuto aktivní SO<sub>2</sub> nás zajímá svou schopností aktivity vůči mikroorganismům ve víně (Baroň, 2013a).

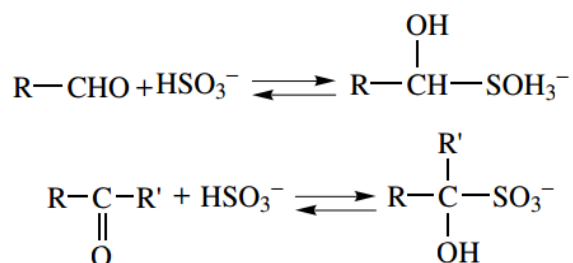
Aktivní forma SO<sub>2</sub> je v podstatě molekulární SO<sub>2</sub>, kde jeho množství záleží na koncentraci volného oxidu siřičitého a pH. K výpočtu je možné použít vzorec, který vyjadřuje procentuální zastoupení molekulárního SO<sub>2</sub> jako funkci pH (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006):

$$\% \text{ molekulárního SO}_2 = 100/10^{(\text{pH}-1.81)} + 1$$

Například při pH 3,2 je procentuálně molekulárního SO<sub>2</sub> 3,91% a při pH 3,8 jenom 1,01%. Tyto výpočty ukazují jak významný vliv má pH. Je třeba čtyřikrát více volného SO<sub>2</sub> při pH 3,8 nežli při pH 3,2 k udržení stejné efektivity (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006). K nárůstu aktivity molekulárního SO<sub>2</sub> dochází také při zvýšení teploty a zvýšení podílu alkoholu ve víně (Baroň, 2013a).

Funkce volného a aktivního SO<sub>2</sub> je nutné posuzovat samostatně, protože vína s nižším pH mají hodnoty molekulárního SO<sub>2</sub> dostačující na zničení a inhibici mikroorganismů, zatímco volný SO<sub>2</sub> je na nízké hranici, než aby dostatečně chránil víno před oxidací. Dávku SO<sub>2</sub> je proto nutné přizpůsobit podle množství volného SO<sub>2</sub> ve víně. (Baroň, 2013a). Jak ovšem vyplývá z výše uvedené rovnice, není možné regulovat množství volného a aktivního SO<sub>2</sub> odděleně. Z tohoto hlediska je také důležité klást důraz na sensorické vnímání vína, jelikož od hladiny 1 mg/l molekulárního SO<sub>2</sub> dochází ke štípání v nose (Baroň, 2013a).

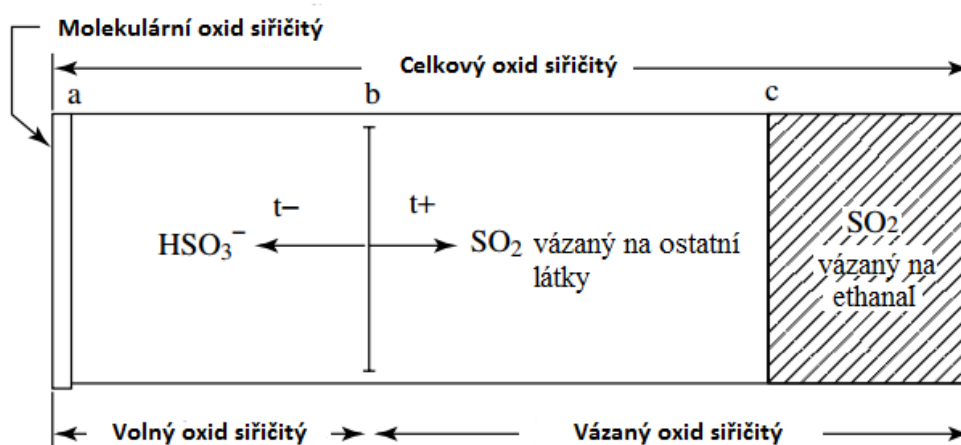
**Vázaný oxid siřičitý** představuje všechny siřičitany vázané na sloučeniny vína (Baroň, 2013a). Hydrogen siřičitany mají schopnost vazby na sloučeniny obsahující karbonylovou skupinu (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006) jako jsou fenoly, aldehydy a cukry (Santa Rosa Junior College, 2014). Mezi nejdůležitější vazby SO<sub>2</sub> ve vínech patří vazby s látkami s jednou nebo více aldehydovými nebo ketonovými skupinami, například: acetaldehyd, kyselina pyrohroznová a kyselina 2-oxoglutarová (Baroň, 2013a). Vazebná kapacita acetaldehydu je 1:1,45, to znamená 44 mg acetaldehydu se váže s 64 mg SO<sub>2</sub> (Murli *et al.*, 2006). Vazbu hydrogensiřičitanu lze vyjádřit obecnými rovnicemi (Obr. 1):



**Obr. 1** Obecné rovnice vazby hydrogensiřičitanu na složky vína (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006)

Z technologického hlediska má vázaný  $\text{SO}_2$  malý význam. Nepůsobí antioxidačně ani na kvasinky a na mléčné bakterie má malý vliv. Na jejich inhibici je třeba asi desetkrát více vázaného oxidu siřičitého než volného  $\text{SO}_2$  (Baroň, 2013a).

**Celkový oxid siřičitý** zahrnuje molekulární, volný a vázaný oxid siřičitý jak je uvedeno na obrázku (Obr. 2).



**Obr. 2** Formy oxidu siřičitého ve víně (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006)

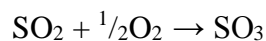
**Endogenní  $\text{SO}_2$**  je vytvořen kvasinkami, jejich enzymatickými procesy. Produkce závisí především na kmeni použitých kvasinek, teplotě a přítomnosti kyslíku. Množství endogenního oxidu siřičitého se pohybuje od několika mg/l až po extrémní případy 150 mg/l. Tato produkce je proporcionalní se spotřebou cukrů. Vyšší je při nižších teplotách ve velmi čirém fermentačním prostředí a v anaerobióze. Produkci  $\text{SO}_2$  redukuje výběrem vhodného kmene kvasinek, které neprodukují či produkují jenom nízké množství oxidu siřičitého. Selekcce kvasinek je velmi důležitá především při výrobě šumivých vín, kde by vysoká hladina  $\text{SO}_2$  působila organolepticky nepříjemně. Množství endogenního  $\text{SO}_2$  je také přímo ovlivněno asimilací síry révou vinnou z půdy a vinohradnických ochranných prostředků obsahujících především elementární síru (Michlovský, 2012).

### 3.1.2 Funkce oxidu siřičitého ve víně

a) Antiseptický účinek inhibuje výskyt a rozvoj mikroorganismů, přičemž větší dopad má na bakterie než kvasinky. Při nízkých koncentracích je potlačení rozvoje mikroorganismů dočasné, s vysokými koncentracemi dochází k značnému úbytku

populace. Efektivita dané koncentrace může být zvýšena například filtrací vedoucí k nižší počáteční populaci mikroorganismů. Během skladování vína je oxid siřičitý překážkou k rozvoji nežádoucích mikroorganismů, jakými jsou octové bakterie, bakterie mléčného kvašení a kvasinky (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006). Aktivní SO<sub>2</sub> proniká rychle do buněk (asi do 2 minut) a v závislosti na případu narušuje jejich rozvoj, růst, rozmnožování, nebo způsobuje smrt buňky. SO<sub>2</sub> mění permeabilitu stěn buněk a reaguje uvnitř buňky s bílkovinami a enzymy. Tato polyvalence oxidu siřičitého vysvětluje neexistenci kmenů rezistentních vůči sulfidům (Michlovský, 2012).

b) Antioxidační funkce spočívá v navázání rozpuštěného kyslíku za přítomnosti katalyzátoru podle reakce:



Tato reakce je pomalá a chrání víno pouze před chemickou oxidací, nikoliv však před enzymatickou oxidací. Oxid siřičitý chrání před oxidací fenolických látek a některých složek aroma. Dále je prevencí před madeirizací a snižuje redukčně-oxidační potenciál vína, což stabilizuje aroma a chuť vína při skladování a vyzrávání (Ribéreau – Gayon *et al.*, 2006).

c) Antioxidativní funkce je založena na potlačení oxidačních enzymů, jakými jsou laktázy a tyrosinázy. Před alkoholovou fermentací oxid siřičitý pomáhá prevenci výskytu hnělobných tónů z napadených hroznů (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006).

d) Antialdehydický účinek oxidu siřičitého chrání především aroma vína a zabraňuje plochosti. Tato ochrana je zajištěna vázáním aldehydů, například etanalů (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006). Za nepřítomnosti volného SO<sub>2</sub> se projevují ve víně specifické pachy acetaldehydu pocházející z alkoholové fermentace či oxidace etanolu. Tyto pachy je nutné blokovat u všech vín s výjimkou tzv. oxidativních vín, jako jsou vína z Jury a sherry vína (Michlovský, 2012).

e) Organoleptické účinky SO<sub>2</sub> spočívají v ochraně barvy vína. Oxid siřičitý redukuje hnědé sloučeniny pocházející z oxidací a mění strukturu antokyanů. Vazba s antokyanem je reverzibilní, a proto, když se SO<sub>2</sub> zpátky vyváže s reaktivnější sloučeninou, navrátí se původní barva. Působení SO<sub>2</sub> na barvu je nepřímé a spočívá v likvidaci oxidázni aktivity, případně zabránění destrukce polyfenolů. Zasiření sklizených hroznů ulehčuje a urychluje extrakci antokyanů a polyfenolů z bobulí. Negativním organoleptickým účinkem je charakteristický pach oxidu siřičitého. Práh

vnímání je ovlivněn celkovým složením roztoku a pH. V bílém sladkém víně může být dávka 400 mg/l SO<sub>2</sub> téměř bez povšimnutí, avšak stejná koncentrace v destilované vodě by působila nesnesitelně (Mchlovský, 2012).

### 3.1.3 Dávkování oxidu siřičitého

Dodání oxidu siřičitého je obvykle vyjadřováno v bezvodé formě v jednotkách mg/l (miligram na litr) nebo g/hl (gram na hektolitr). Oxid siřičitý se do vína dodává v plynné formě SO<sub>2</sub>, jako roztok SO<sub>2</sub> nebo v pevném skupenství jako hydrogen siřičitan draselný a disiřičitan draselný. Efekt přidání do vína je stejný bez ohledu na použitou formu (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006).

Maximální povolený obsah celkového oxidu siřičitého je limitován zákonným nařízením Evropského společenství č. 1493/1999 a č. 203/2012. V roce 1907 povolovala francouzská legislativa až 350 mg/l a v roce 1926 byla mezní hodnota dokonce navýšena na 450 mg/l. V současnosti je přípustné množství SO<sub>2</sub> vázáno zákonnými předpisy Evropské unie. Pro většinu červených vín je omezení celkového SO<sub>2</sub> 160 mg/l a u bílých vín 210 mg/l. Rozdílné limity platí pro speciální vína a vína s vysokým zbytkovým cukrem.

Ve vinařských státech mimo Evropskou unii jsou pravidla odlišná, například ve Spojených státech Amerických, Kanadě, Japonsku a Austrálii je paušální omezení pro všechna vína 350 mg/l celkového oxidu siřičitého (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006).

### 3.1.4 Zdravotní hledisko oxidu siřičitého

Enologický SO<sub>2</sub> představuje riziko především při vdechování jeho plynné formy a při požití v nápojích. Siřičitany jsou skupinou aditiv, které způsobují největší zdravotní rizika především astmatikům. SO<sub>2</sub> se vyskytuje v ovzduší kvůli emisím z průmyslu a sopečné činnosti, a může způsobovat bolesti hlavy, podráždění sliznic a kašel. Maximální nejvyšší výskyt v ovzduší za 1 hodinu by neměl překračovat 350 µg/m<sup>3</sup> a během 24 hodin hodnotu 125 µg/m<sup>3</sup> (Mchlovský, 2012).

Ve sklepním hospodářství se práh čichové detekce uvádí 0,5 µg na litr vzduchu, přičemž hranice zdravotního rizika je 0,6 µg na litr vzduchu. Akutní rizika jsou vzácná, bývají způsobena náhlým únikem SO<sub>2</sub> z tlakové lahve, avšak jsou velmi vysoká. Akutní intoxikace může vést ke slepotě až smrti. Oxid siřičitý je toxický již při nízkých koncentracích. Některé zdroje uvádějí mezní hodnotu koncentrace 2 ppm SO<sub>2</sub> (ppm

odpovídá  $\text{cm}^3/\text{m}^3$ ) během patnácti minutové expozice. Tato hodnota je 15 000 krát nižší než u oxidu uhličitého. Oxid siřičitý je kyselý dráždivý plyn, působící synergicky s oxidem uhličitým, kyselinou octovou a alkoholem, a napadá receptory čichu (Michlovský, 2012).

Příznaky akutní intoxikace jsou prudký dávivý kašel, prudké podráždění očí a bolest v hrudníku. Mezi příznaky chronické otravy patří praskání zubní skloviny, podráždění očí, dýchacích cest a poruchy čichu. Astmatikům a osobám s dýchacími potížemi se důrazně nedoporučuje manipulace s  $\text{SO}_2$ . Při manipulaci s čistým oxidem siřičitým je doporučeno použití osobních ochranných prostředků, jakými jsou rukavice, pracovní oděv, brýle a maska s filtrem E (Michlovský, 2012).

Akutní toxicita oxidu siřičitého byla zkoumána v mnoha studiích. Pokusy na živočiších ukázaly rozdílnost toxicity jedné dávky v závislosti na druhu živočicha. Dostupné zdroje uvádí  $\text{LD}_{50}$  (smrtelná dávka pro 50% populace) v rozmezí 0,7 až 2,5 g/kg (gramů  $\text{SO}_2$  na kilogram tělesné hmotnosti), (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006).

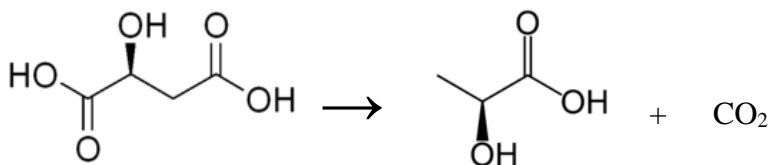
Z hlediska příjmu  $\text{SO}_2$  z potravin je víno nejvýznamnějším zdrojem. Akutní toxicita je stanovena na 1,5 g/kg, toto množství je přibližně shodné s kuchyňskou solí a hydrogenuhličitanem sodným, běžně používanými v potravinářství. Chronická toxicita  $\text{SO}_2$  je stanovena na 0,35 mg/kg/d. Mutagenní působení bylo pozorováno při vysokých dávkách pouze *in vitro*. Oxid siřičitý je v organismu rychle detoxifikován transformací na sírany. Výjimku ovšem tvoří osoby, u kterých jejich organismus nemetabolizuje enzym sulfit-oxidázu. Při dávkách oxidu siřičitého povolených ve vínech v Evropské unii nebyla doposud toxicita prokázána (Michlovský, 2012).

## **3.2 Technologické metody snížení potřeby $\text{SO}_2$**

### **3.2.1 Jablečno-mléčné kvašení**

Jablečno-mléčné kvašení, taktéž nazývané malolaktická fermentace, je biologický proces, při kterém dochází k přeměně kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou a oxid uhličitý (Mendelu, 2013). Kyselina jablečná (Obr. 6) je ostře chutnající dikarboxylová kyselina, která je při procesu jablečno-mléčného kvašení za přítomnosti specifických bakterií přeměněna na monokarboxylovou kyselinu mléčnou (Obr. 7), což má za následek zjemnění chuti. Lze také hovořit o přeměně malátu na laktát. Kyselina jablečná není jedinou kyselinou, která je zpracovávána. Významná je i reakce kyseliny

citronové (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006). Malolaktickou fermentaci lze stručně popsat níže uvedenou rovnicí (Obr. 3). Tato reakce byla objevena již v roce 1901 (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006).



**Obr. 3** Reakce malolaktické fermentace, reaktant kyselina L-jablečná, produkty kyselina L-mléčná a oxid uhličitý (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006)

Jablečno-mléčné kvašení má při výrobě vína mnoho funkcí, mezi které patří snížení acidity, bakteriální stabilita finálního produktu, snížení spotřeby oxidu siřičitého a ovlivnění aromatu vína.

Bakterie mléčného kvašení jsou gram pozitivní organismy. Nacházejí se přirozeně v přírodě a jsou pro člověka důležité při výrobě mnoha fermentovaných potravin a nápojů. Nejužívanější bakterií k MLF ve vinařství je *Oenococcus oeni* neboli *Leuconostoc oenos* (Obr. 8). Tato bakterie je fakultativní heterofermentor, což znamená, že preferuje glykolýzu hexóz za vzniku kyseliny mléčné, avšak za určitých podmínek, například provzdušnění, může fermentovat pentózy (Bisson, 2001). Biologické odbourání kyselin (BOK) se odkazuje na přeměnu malátu na laktát, jak již bylo zmiňováno, což vede k zisku energie ve formě ATP (Baroň, 2013b). Dalšími bakteriemi, které se mohou vyskytovat ve víně, jsou například: *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* (Bisson, 2001). Jedním z hlavních faktorů, zda bude ve víně převládat požadovaný *Oenococcus oeni*, nebo ostatní druhy bakterií, je pH. Při pH pod hodnotu 3,5 bude převládat právě *Oenococcus oeni*, a proto je pro správný průběh MLF velice důležitá hodnota pH.

#### **Funkce MLF v enologii:**

- a) Snížení acidity se v současnosti běžně používá v technologii výroby červených vín. Vyšší kyseliny jsou u červených vín nežádoucí z organoleptických důvodů. Odkyselení nemusí být žádoucí u vín s již nízkou kyselostí, obzvláště bílých. Tato konverze však může snadno nastat spontánně, a výsledná vína často vykazují nízkou kvalitu. Odbouráním



kyselin při MLF může dojít ke zvýšení pH o 0,1 až 0,3 jednotek (Baroň, 2013b). Tyto hodnoty odpovídají poklesu titrovatelných kyselin o 0,01 až 0,03 g/l, z důvodu fixace vodíkových kationtů (Bisson, 2001).

- b) Bakteriální stabilita je velmi prospěšný důsledek malolaktické fermentace. Toto je způsobeno zaprvé spotřebováním výživných látek při řízené MLF, a zadruhé mohou bakterie jablečno-mléčného kvašení produkovat bakteriociny, látky, které brání rozvoji dalších bakterií. Stabilita je velmi důležitá z toho důvodu, aby v průběhu skladování již nalahvovaného vína nedošlo ke spontánní neřízené aktivitě divokých bakterií.
- c) Ovlivnění aromatu vína je důsledkem vedlejších reakcí, ať už cíleně používané bakterie *Oenococcus oeni*, tak ostatních přítomných kmenů. Jedním z nepříjemných metabolických produktů může být kyselina octová, která pochází z transformace kyseliny citronové heterofermentativními koky nebo homofermentativními laktobacily. Dalšími látkami, které se mohou vyskytnout, jsou diacetyl, glyoxal, methylglyoxal. *Oenococcus oeni* je schopen metabolizovat metionin a cystein za vzniku vonných sírných produktů. Cystein může transformovat na sirovodík a metabolizací methioninu vznikají dimetyl disulfid a 3- (metasulfanyl) propionová kyselina (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006).

Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují průběh MLF, patří mezi ně především hodnota pH, množství přítomného SO<sub>2</sub>, množství a skladba přítomných výživných látek, teplota, provzdušnění, obsah organických kyselin, fenolických látek a etanolu.

Jedním z nejdůležitějších aspektů je hodnota pH, a to především z toho důvodu, jaké mléčné bakterie budou dominovat, a zda vůbec bude MLF probíhat. Jako limitní hodnota se uvádí pH 2,9, pod níž už jablečno-mléčná fermentace nemá příznivé podmínky (Bisson, 2001).

Z hlediska managementu oxidu siřičitého, je možné odhadovat pouze přibližné množství aplikovaného SO<sub>2</sub> potřebného k inhibici rozvoje bakterií. Záleží především na bakteriálním kmeni a pH. Jako obecné pravidlo by platilo, že jablečno-mléčné bakterie mají potíže v rozvoji při koncentracích převyšujících 100 mg/l celkového SO<sub>2</sub> a 10 mg/l volného SO<sub>2</sub> (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006). Obecně lze říci, že bakterie jsou mnohem citlivější na SO<sub>2</sub> než kvasinky. Pro mléčné bakterie je inhibiční i vázaný oxid siřičitý (Bisson, 2001).

Co se týče přítomnosti výživných látek, tak bakterie jsou „mnohem vybíravější“ než kvasinky, jinými slovy požadují mnohem více nutričních látek (Bisson, 2001). Z tohoto důvodu je například výhodné využít autolýzu kvasinek jako zdroje nutričních látek, jak je tomu při níže popsané metodě *sur-lie*.

Pro příznivý průběh MLF je dále důležitá teplota optimálně v rozmezí 20 -37 °C, ne nižší než 15 °C a obsah alkoholu pod 14 % (Bisson, 2001). Přítomnost kyslíku v malém množství stimuluje růst mléčných bakterií (Baroň, 2013a).

U technologie malolaktické fermentace je před jejím zahájením důležité zvolit vhodný postup. Prvním rozhodnutím je, zda bude MLF probíhat spontánně, nebo po inokulaci zvoleným druhem bakterií. A dále je zapotřebí vybrat časování kdy inokulovat. Nabízí se čtyři varianty: inokulace před alkoholovou fermentací, koinokulace společně s kvasinkami, inokulace v průběhu alkoholové fermentace a post-fermentační inokulace (Baroň, 2013a). Každá ze zvolených variant má samozřejmě svoje klady a rizika.

Požadované snížení potřeby oxidu siřičitého spočívá především v bakteriální stabilizaci vína a zrušení vazebných míst, kam by se volný SO<sub>2</sub> mohl navázat. V oblasti potencionálních vazebných míst a jejich zrušení je ovšem doposud málo studií, a je zapotřebí další výzkum.

### 3.2.2 Technologie *sur-lie*

*Sur-lie* je označení technologie pocházející z Burgundska a znamená „na kvasničných kalech.“ Tento název vystihuje metodu, kdy je víno po alkoholové fermentaci a hrubém odkalení ponecháno na jemných kvasničných kalech.

V zásadě se pod tímto pojmem rozumí ponechání hotového, prokvašeného vína na kvasničných kalech, kdy časem dochází k autolýze kvasinek – rozpuštění buněčné stěny, a tak k přechodu různých látek obsažených uvnitř kvasinek do vína. Úspora síření spočívá ve využití redukční síly kvasinek. Vína typu *sur-lie* se nevyrábějí jen pro úsporu SO<sub>2</sub>, ale především kvůli vzniku kulatějších a stabilnějších vín s delší životností. U vín *sur-lie* je často požadováno biologické odbourání kyselin, a tak je mošt či mladé víno sířeno jen minimálním množstvím SO<sub>2</sub> (Baroň, 2013a).

Metodu *sur-lie* je možno provést ve skleněných nádobách, nerezových tancích i dřevěných sudech. Proces zrání na kalech je důležité pravidelně kontrolovat, aby nedocházelo ke vzniku nežádoucích vad vína. Kvasnice je vhodné dvakrát týdně rozmíchávat v celém objemu nádoby. Intenzivní míchání se potom nazývá *battonage*. Optimální

teplota je v rozmezí 9 – 12 °C. Proces zrání vína je zapotřebí ukončit na základě senzorního zhodnocení (Pavloušek, 2010).

Když mladé víno ponecháme na kvasinkách, po delší době dojde k jejich autolýze a uvolnění dusíkatých látek, polysacharidů a glykoproteinů. Tyto látky mají následně široký význam, ať už jako výživa pro bakterie MLF, látky zakulacující aroma a chuť, tak jako složky chránící vonné látky proti oxidaci. (Baroň, 2013a)

Z hlediska managementu oxidu siřičitého je v první řadě důležité pro metodu *sur-lie* vybírat hrozny s nízkým obsahem elementární síry. Jedná se především o síru pocházející z ochranných prostředků ve vinohradu. Použitím nevhodných hroznů se zvyšuje riziko vzniku sirných tónů ve víně. Vína obsahují malé množství endogenní SO<sub>2</sub>, jak již bylo v této práci pojednáváno. Enzymatické systémy kvasinek transformují málo se vyskytující elementární síru na sirné aminokyseliny, jakými jsou cystein, cystin, metionin a glutation. Produkovány jsou i další aminokyseliny ze sulfidů a jiných těkavých vonných sloučenin, ze síranů a siřičitanů. Produkce SO<sub>2</sub> se pohybuje od několika mg/l až po 40 mg/l, v některých situacích až do 150 mg/l. Tato produkce je proporcionální se spotřebou cukrů. Vyšší je při nižších teplotách a především v anaerobních podmínkách, dále ve velmi čirém fermentačním prostředí s nízkou turbiditou moštu, tedy v ostře vyčiřených moštech, stejně jako při nedostatku aminokyselin metioninu či cysteinu. Závisí také na kmenu kvasinek, je vyšší u kmenů citlivých na SO<sub>2</sub>, které je možné snadno tlumit zasiřením moštu. V praxi není doporučeno sířit po alkoholové fermentaci, neboť kaly mají vysokou antioxidační schopnost (Baroň, 2013a). Této výhody se také využívá při následné MLF, kdy nízká hladina volného SO<sub>2</sub> je příznivá pro správný rozvoj požadovaných mléčných bakterií, a zároveň uvolněné dusíkaté látky z autolýzy kvasinek slouží jako výživa bakterií jablečno-mléčného kvašení.

### 3.2.3 Tangenciální filtrace

Tangenciální filtrace, taktéž nazývaná cross-flow filtrace, je technologický způsob možnosti snížení spotřeby oxidu siřičitého. Tangenciální filtry jsou schopny přefiltrovat víno tak, že filtrát je sterilní, bez přítomnosti kvasinek a bakterií. Tohoto způsobu ošetření vína se může využít k zastavení alkoholové fermentace a mikrobiální stabilizaci před lahvováním (Kosseva, 2006).

### 3.3 Fyzikální metody snížení potřeby SO<sub>2</sub>

#### 3.3.1 Pasterace

Pasterace (dnes používaný také název *pasterizace*) je v současné době hojně rozšířenou metodou konzervace a ošetření mnoha potravinářských výrobků, avšak v enologii není tato metoda příliš používána. Pasterace má totiž vliv na sensorický projev vína. Z historického hlediska byla tato metoda objevena v 19. století francouzským vědcem Louisem Pasteurem, jako prostředek k zamezení octovatění vína (Baroň, 2013a). Pasterace může být provedena buď za zvýšené teploty po krátký časový úsek, nebo za snížené teploty působící po delší čas.

Takzvané lahvování za tepla může zajistit stabilitu červeného vína proti bakteriálnímu rozvoji a ochranu proti refermentaci v případě sladkých bílých vín. Obecně se pasterace používá u vín průměrné kvality, která mají problém se stabilizací. Zahřátí na 45 nebo 48°C sterilizuje víno i lahev (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006). Možné oxidaci se předchází přítomností 30 mg/l volného SO<sub>2</sub> (Baroň, 2013a). Zasiřením vína se zvyšuje citlivost kvasinek na teplo (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006). Pokud je použito vhodné zařízení, mohou se lahvovat sladká vína se stejnou koncentrací volného SO<sub>2</sub>, jako v případě suchých bílých vín. Díky tomu je celková koncentrace SO<sub>2</sub> významně snížena. Sladká vína s obsahem pouhých 30 mg/l volného SO<sub>2</sub> obsahují v průměru o 60 mg/l méně veškerého SO<sub>2</sub> než vína obsahující 50 mg/l volného SO<sub>2</sub>, což je koncentrace nezbytná pro zamezení kvašení nepasterovaných vín (Baroň, 2013a).

#### 3.3.2 Ultrafialové záření

Ultrafialové záření (zkratka UV z anglického ultraviolet) je elektromagnetické záření s krátkou vlnovou délkou, kratší než je viditelné spektrum (Baroň, 2013a), což znamená pod 400 nm. Přirozeným zdrojem záření je Slunce. UV záření je studováno jako možná metoda, bez přílišného ovlivnění sensorických vlastností. Je testována za účelem snížení koncentrace SO<sub>2</sub> (Baroň, 2013a). UV záření má podobnou inhibiční účinnost proti znehodnocujícím mikroorganismům jako SO<sub>2</sub>, a to bez ovlivnění ostatních kvalitativních parametrů (pH, kyselina vinná, obsah alkoholu). Jeho užití by však bylo, vzhledem k možné oxidaci, vhodné použít v kombinaci s menším množstvím SO<sub>2</sub>. Při testování této metody proběhly jisté barevné změny, proto by bylo vhodné proces více optimalizovat. Mikrobiální inhibice způsobená UV zářením (vlnová délka

254 nm) je založena na přeskupení nukleových kyselin, což přímo zasahuje do schopnosti mikroorganismů reprodukovat se. Konečná účinnost UV záření závisí na vzhledu a vlastnostech produktu (barva, absorbance, hustota, rozpuštěné a nerozpuštěné látky), které mohou zabránit v proniknutí UV záření k mikroorganismům (Baroň, 2013a).

V případě použití ve vinařství je možné použít přístroje, které se nazývají excimerové lasery. Tyto přístroje emitují záření o vlnových délkách 193, 248, 308 a 351 nm při intenzitě osvětlení 100 lx/s a radiačním výkonu 100 W. Ultrafialové záření o vlnové délce 248 a 308 nm vykazuje vysokou efektivitu při sterilizaci vína. Problematická, z hlediska použití UV záření k ošetření většího objemu vína, je časová náročnost. Nemůže být ozářena pouze hladina, ale je zapotřebí ošetřit celý objem. Nabízí se možnost čerpání vína skrz tenké potrubí rychlostí maximálně 7 l/min, které bude ozařováno. Z organoleptického hlediska nemá UV záření na víno vliv, ovšem velmi omezujícím faktorem použití této technologie je finanční náročnost (Delfini *et al.*, 2001).

### 3.3.3 Ultrazvuk

Ultrazvuk je akustické vlnění s frekvencí vyšší, než je člověkem slyšitelná hranice, která odpovídá přibližně 20 kHz (Cullen *et al.*, 2012). Je známé, že ultrazvuk má letální účinky na kvasinky, avšak ne na jejich spóry (Delfini *et al.*, 2001).

Příznivé účinky ultrazvuku jsou testovány jako prostředek k ošetření vína a snížení přídatku oxidu siřičitého. Ultrazvuk s frekvencemi mezi 20 a 100 kHz má schopnost deformace a kavitace. Usmrcení mikroorganismů je způsobeno především ztenčováním buněčných membrán, lokálním nárůstem teploty a vznikem volných radikálů (Bartowsky, 2008). Šíření ultrazvukových vln způsobuje vznik přechodných mikro bublin, nárůst regionálních tlaků až 50 MPa a extrémní teploty dosahující i 5000 K. Současně dochází ke vzniku mikro proudů o rychlosti až 150 m/s. Nedílnou antibakteriální funkcí je vznik volných radikálů. Souhrnně by se dal efekt ultrazvuku charakterizovat jako kombinace sonochemické reakce a mechanického stresu (Cullen *et al.*, 2012). Bylo zjištěno, že větší efektivitu mají zvuky s vyšší frekvencí. Mimo antimikrobiální vlastnosti byl pozorován pozitivní vliv na extrakci fenolických látek (Baroň, 2013a).

### 3.3.4 Pulzní elektrické pole

Pulzní elektrické pole (PEF – z anglického pulsed electric field) je technologie která představuje rychlou, „bezohřevnou“ a vysoce účinnou techniku pro inhibici patogenních organismů v potravinách, aniž by došlo ke kvalitativním změnám (Baroň, 2013a). Metoda je založena na působení pulzů elektrického pole v řádech mikrosekund o vysoké intenzitě dosahující hodnoty 15 – 50 kV/cm. Intenzivní elektrické pole generuje změny potenciálu na buněčných membránách, které jsou ireverzibilní a vedou ke kolapsu membránové struktury (Cullen *et al.*, 2012).

Technologii lze využít ve vinařství jako alternativní metodu k usmrcení až 99,9 % mikroflóry, která způsobuje znehodnocení moštu a vína, například: *Brettanomyces* sp. a *Lactobacillus* sp. (Baroň, 2013a).

U bílých hroznů bylo dokonce zjištěno významné zvýšení jejich výlisnosti (o 20 až 50 %). Metoda je účinnější, použije-li se ještě před lisováním než v jeho průběhu. Navíc mošty ošetřené PEF technologií se prokázaly jako méně náchylné ke zhnědnutí. Pozitivní vliv byl zjištěn i při výrobě červených vín, kdy PEF přispělo k lepší extrakci polyfenolů a antokyanů ze slupek (Baroň, 2013a). Jak uvádí literatura, výzkum ukázal na provedeném pokusu vliv PEF. Zpracovány byly hrozny odrůdy Chardonnay, na které bylo působeno pulzním elektrickým polem při trvání jednoho pulzu 1000 ms při intenzitě 1,3 kV/cm za sekundu, což odpovídá energii 120 kJ/kg. Po 60 minutách extrakce při 20°C způsobilo PEF dvojnásobnou koncentraci fenolů oproti kontrolnímu vzorku bez působení PEF. Tato skutečnost byla potvrzena i následnou vysokotlakou kapalinovou chromatografií (Puertolas *et al.*, 2010).

### 3.3.5 Vysoký hydrostatický tlak

Vysoký hydrostatický tlak (zkráceně HHP z anglického High Hydrostatic Pressure) je metoda známá již přes sto let, původně byla zkoušena jako prostředek k ošetření mikrobiální stability mléka (Bartowsky, 2008). Z hlediska použití HHP k antimikrobiální stabilizaci vína a piva je tato metoda novinkou. Bylo zjištěno, že HHP působí destruktivně na mikroorganismy, a navíc vylepšuje některé organoleptické vlastnosti jak u piva, tak u vína, a to bez nepříznivého ovlivnění důležitých kvalitativních parametrů (barva, pH a zákal). HHP má obrovský potenciál v kontextu snížení dávkování SO<sub>2</sub>. Při této metodě se používá tlak v rozmezí 400 až 600 MPa (Baroň, 2013a).

Tyto hodnoty tlaku se ukázaly jako velice efektivní v likvidaci mikroorganismů a enzymů přítomných ve víně (Santos et al., 2013).

Použití HHP po dobu dvou minut, s tlakem o hodnotě 400 MPa a o počáteční teplotě moštu 20 °C, je schopno usmrtit ve víně všechny mikroorganismy. Další studie uvádí, že aplikace 500 MPa po dobu 5 minut má za následek značné snížení populace počáteční mikroflóry, jako je *Saccharomyces cerevisiae*, *Brettanomyces bruxellensis* a *Oenococcus oeni*, aniž by došlo k změně chemických nebo organoleptických vlastností vína. Bylo prokázáno, že inhibice mikroorganismů se zvyšuje s navyšujícím se tlakem a časem jeho působení (Baroň, 2013a).

V roce 2013 byla publikována studie, ve které byly zkoumány především organoleptické účinky působení HHP na 4 vzorky červeného vína. Po aplikaci HHP po dobu 5 minut při 20 °C byly vzorky skladovány 12 měsíců v temnu při relativní vlhkosti 80% a teplotě 10 – 15 °C. Jednotlivými studovanými vzorky byly:

Víno ošetřené HHP 425 MPa, Víno ošetřené HHP 500 MPa, Víno ošetřené oxidem siřičitým a víno bez aplikace HHP a bez dodaného SO<sub>2</sub> (Santos et al., 2013).

Následně byly analyzovány tři významné organoleptické parametry, a to intenzita barvy, celkový obsah antokyanů a celkový obsah fenolických látek. Testy byly provedeny na základě slepé degustace a objektivními měřicími metodami. Vyhodnocení výsledků poukázalo na vliv ošetření vysokým hydrostatickým tlakem vína. Změna chemického i sensorického charakteru byla patrná až po 9 měsících skladování. Obzvláště vína, na něž byl aplikován HHP, vykazovala vyšší oranžovočervený odstín barvy, nižší antioxidační aktivitu a nižší celkový obsah antokyanů ve srovnání s víny bez ošetření HHP. Podle autorů této studie, jsou tyto změny podobné jako u vín skladovaných po dlouhou dobu. Z tohoto hlediska se zdá, že vysoký hydrostatický tlak aplikovaný před skladováním má na víno z hlediska změny charakteru vliv, jako roky skladování, ovšem bez celkové změny aromatu, chuti a sensorické kvality. Z provedené studie není zřejmé, jak působí vysoký tlak proti mikroorganismům, a jak plní ostatní funkce SO<sub>2</sub> dodávaného do vína (Santos et al., 2013).

### 3.3.6 Světelné pulzy

Antimikrobiální vlastnosti světelných pulzů jsou dle literatury studovány u potravin jako je med a mléko, ovšem mohly by se jevit jako prospěšné i v případě ošetření vína. Technologie světelných pulzů je založena na působení

elektromagnetického vlnění v rozsahu vlnových délek od ultrafialového po infračervené spektrum v několika pulzech za sekundu, přičemž každý z pulzů působí po velmi krátkou dobu pohybující se v rozmezí 100 nanosekund až 2 milisekund. Navzdory vysoké intenzitě záření, jsou krátké pulzy prevencí před přehřátím za současného zachování inaktivačních mechanismů vůči mikroorganismům. Světelné pulzy mají dvojitý efekt a to fotochemický a fototermický. Nevýhodou světelných pulzů je nízká penetrační schopnost do kapaliny, která je velmi závislá na optických vlastnostech média. Transport elektromagnetického vlnění do ošetřované kapaliny probíhá pouze v blízkosti hladiny (Cullen *et al.*, 2012). V případě použití světelných pulzů k ošetření mikrobiální stability vína je zapotřebí další výzkum, který by poukázal na perspektivu využití této metody.

### 3.3.7 Ohmické zahřívání

Využití ohmického zahřívání za účelem mikrobiální stabilizace kapalných potravin je předmětem výzkumů, které časem mohou ukázat, zda je tato metoda využitelná v enologii

Tato nově zkoumaná termální metoda je založena na elektrickém odporu kapaliny připojené k elektrodám. Obvykle je používáno elektrické pole nepřesahující intenzitu 1 kV/cm. Ohmické zahřívání se jeví jako efektivní a rychlá metoda bez tepelných rázů, zajišťující pasteraci, blednutí a dehydrataci. Primárním efektem je teplotní nárůst kapaliny, tím druhým je působení přímo elektrického pole (Cullen *et al.*, 2012). Účinky na organoleptické změny jsou diskutabilní a je třeba dalších studií.

## 3.4 Chemické metody snížení potřeby SO<sub>2</sub>

### 3.4.1 Použití inertních plynů

Inertní plyny se ve vinařství doporučuje používat při skladování vína jako ochranu před nežádoucími účinky chemické a mikrobiologické oxidace, sníženém kontaktu se vzduchem. Přístup vzduchu k vínu je možné limitovat několika způsoby, jednou z možností je uchovávání v tancích zcela zaplněných vínem. Tyto skladovací kontejnery mohou být vybaveny systémem kompenzujícím dilataci. Tento způsob skladování je ovšem nevhodný, pokud je víno průběžně odebíráno.



Další z možností je použití tanků s takzvaným plovoucím víkem, které snižuje kontakt hladiny se vzduchem, avšak jejich efektivita je diskutabilní.

Uspokojivé výsledky nabízí uchovávání vína v částečně naplněných tancích pod ochrannou atmosférou inertního plynu bez kontaktu s kyslíkem. Povolnými inertními plyny jsou dusík, oxid uhličitý a argon. Argon je zřídka užívaným plynem, protože je méně rozpustný než ostatní (4 l/hl) a je dražší. Oxid uhličitý je ve víně velmi rozpustný (107,2 l/hl), a proto nemůže být použit samostatně. Někdy se používá ve směsi s dusíkem například 15% CO<sub>2</sub> a 85% N<sub>2</sub>. Dusík je nejpoužívanějším inertním plynem. Bývá používán s nepatrným obsahem kyslíku, který ovšem nemá na víno vliv. Dusík je ve víně méně rozpustný než kyslík, avšak na rozdíl od kyslíku nereaguje se složkami vína. Při metodě skladování pod inertní atmosférou je důležitá vzduchotěsnost tanků a přetlak inertního plynu, který se kontroluje manometrem z důvodu monitoringu případných netěsností. Skladovací tanky jsou také vybaveny přetlakovým ventilem, který eliminuje případné následky nadměrného přetlakování (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006).

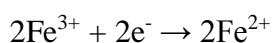
### 3.4.2 Kyselina askorbová

Kyselina askorbová (Obr. 9), neboli vitamín C je přítomný v hroznech v malém množství cca 50 mg/l moštu. Ovšem při fermentaci se obsah kyseliny askorbové rapidně snižuje, a proto ve víně v podstatě žádná přirozeně není (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006).

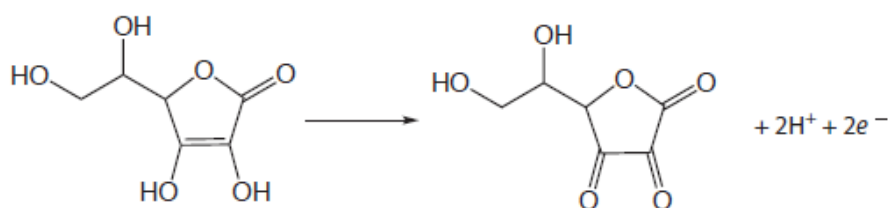
V enologii se kyselina askorbová používá jako redukční činidlo, antioxidant. Její maximální koncentrace je stanovena na 150 mg/l, avšak doporučené dávkování je mezi 50 mg/l a 100 mg/l. Vyšší koncentrace mohou mít vliv na chuť vína. Kyselina askorbová je užívána v kombinaci s oxidem siřičitým (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006).

Oxid siřičitý a kyselina askorbová mají rozdílné antioxidační vlastnosti. SO<sub>2</sub> je principiálně slabý antioxidant s opožděným, ale slabým účinkem, který trvá i v přítomnosti následného okysličení. SO<sub>2</sub> nedokáže zabránit železitému zákalu, který vzniká rychle po provzdušnění. Reakce kyslíku s kyselinou askorbovou je téměř 1700krát rychlejší než reakce kyslíku s SO<sub>2</sub>. Kyselina askorbová má proto účinek okamžitý, může tak eliminovat škody způsobené náhlým a intenzivním provzdušněním, ale působí pouze tak dlouho, dokud není víno v trvalém kontaktu se vzduchem (Baroň, 2013a).

Princip ochrany vína proti železitému zákalu je za přítomnosti kyseliny askorbové znázorněn rovnicí:

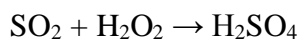


V této reakci dochází k redukci železitých iontů na ionty železnaté. Tomuto redoxnímu ději předchází teoreticky vratné reakce kyseliny askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou, při níž jsou uvolněny potřebné elektrony. Reakci popisuje schéma na (Obr. 4).:



**Obr. 4** Reakce kyseliny askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou, vodíkové kationty a elektrony (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006)

V přítomnosti kyslíku vede oxidace kyseliny askorbové k tvorbě peroxidu vodíku (Obr. 10), který je silným oxidantem. Vznikající peroxid reaguje s přítomným volným oxidem siřičitým, který tímto zabraňuje nežádoucím účinkům  $\text{H}_2\text{O}_2$  na ostatní složky vína. Reakci je možné popsat rovnicí (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006).:



### 3.4.3 Kyselina sorbová

Kyselina sorbová (Obr. 11) je monokarboxylová kyselina se dvěma dvojnými vazbami, která existuje ve čtyřech izomerech, avšak pouze izomer *trans-trans* (Obr. 12) je užíván v enologii. Z důvodu efektivity je používání kyseliny sorbové povoleno v mnoha vinařských státech v množství nepřesahujícím 200 mg/l, avšak v zemích jako je Rakousko a Švýcarsko je přidavek této látky zakázán (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006).

Kyselina sorbová je bílá krystalická látka dobře rozpustná v etanolu (112 g/l při 20°C) a málo rozpustná ve vodě (1,6 g/l při 20°C), z tohoto důvodu se v enologii

používá ve formě sodné a draselné soli, které jsou dobře rozpustné. Sorbát draselný (Obr. 13) obsahuje 75% kyseliny sorbové. Roztok 200 g kyseliny sorbové na litr je připraven rozpuštěním 270 g sorbátu draselného v 1 litru vody. Jedním litrem tohoto roztoku je možné ošetřit 10 hl vína. Dávkování koncentrovaného roztoku musí probíhat pozvolna a za stálého míchání vína, v opačném případě by docházelo k vysrážení kyseliny sorbové. Doporučuje se také používání dávkovacích pump (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006).

Fungicidní vlastnosti byly studovány v mnoha experimentech (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006). Kyselina sorbová je také schopna zastavit plně kvasící mošt, ale ta musí být použita výhradně pro ochranu vín s obsahem redukcujících cukrů, aby se zabránilo jejich budoucímu rozkvašení. V suchých vínech nemá žádné využití a v červených vínech či vínech z přezrálé suroviny může vyvolat pelargóniové tóny (Baroň, 2013a). Studie ukázaly závislost použité dávky na složení vína, především na kmenech kvasinek použitých k fermentaci, na množství počátečního inokula, obsahu alkoholu a pH. V laboratorních experimentech bylo ukázáno, že dávka 150 mg/l kyseliny sorbové při pH vína 3,1 byla dostačující k potlačení druhotného rozkvašení, naproti tomu při pH 3,5 a zachování ostatních faktorů bylo třeba aplikovat 300 mg/l. Kromě účinku na běžné fermentativní kvasinky byl zjištěn fungicidní vliv na divoké organismy kmene *Candida*, vyskytující se při povrchu vína (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006).

Kyselina sorbová má nízké antibakteriální účinky, prakticky nevykazuje žádné proti octovým a mléčným bakteriím. Potřebná dávka k potlačení rozvoje bakterií by se pohybovala mezi 500 až 1000 mg/l. Popsané vlastnosti ukazují selektivitu proti mikroorganismům obsažených ve víně, kde na rozdíl od oxidu siřičitého potlačují rozvoj kvasinek a nikoliv bakterií. V této souvislosti je nutné kyselinu sorbovou bezpodmínečně používat v kombinaci s oxidem siřičitým, ovšem jejím přídavkem můžeme právě množství dodaného SO<sub>2</sub> snížit (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006).

S ohledem na gustatorický projev roztoku kyseliny sorbové nebyl pozorován vliv na aroma ani chuť při dodržení maximální koncentrace 200 mg/l. Ovlivnění aromatu čerstvě ošetřených i déle skladovaných vín při vhodných podmínkách nebylo zjištěno. Při nedodržení vhodných skladovacích podmínek, nadměrném přístupu vzduchu, vysoké dávce v hodnotách nad 400 mg/l a bakteriální aktivitě, se kyselina sorbová může projevit pachem po pelargóniích (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006). Dojde-li k nadměrnému nárůstu mléčných bakterií, může nastat rozklad kyseliny sorbové na 2-ethoxy-3,5-hexandien, čímž vzniká vada vína – pach po pelargóniích (Baroň, 2013a). Vhodné pou-

žití se jeví v případě konzervace vín s vyšším zbytkovým cukrem a nižším pH jako ochrana proti refermentaci.

#### 3.4.4 Mastné kyseliny

Některé vyšší mastné kyseliny, s počtem uhlíků v řetězci 16 a 18, jsou důležité pro aktivaci fermentace, naopak kyseliny obsahující 8 a 10 uhlíků v řetězci vykazují fungicidní účinky. Z chemického hlediska se jedná o kyselinu oktanovou (kyselinu kaprylovou) a kyselinu dekanovou (kyselinu kaprinovou). Studie ukázaly pozitivní vliv na stabilizaci sladkých vín, avšak aplikovaná dávka by neměla překročit 10 mg/l, například kombinace 3 mg kyseliny oktanové a 6 mg kyseliny dekanové. Tyto kyseliny se pro užívání připravují vysrážením etanolem (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006).

Praktickým využitím mastných kyselin může být zastavení alkoholové fermentace sladkých vín, takzvaná *mutage*. Bylo zjištěno, že kombinace 150 mg SO<sub>2</sub> a 9 mg mastných kyselin na litr má stejné účinky jako 250 mg oxidu siřičitého. Při použití této technologie by měly být mastné kyseliny aplikovány 24 hodin před sířením. Tato metoda umožňuje konzervaci sladkých vín při pouhých 40 mg/l volného SO<sub>2</sub>. Vzhledem k intenzivnímu aroma těchto kyselin a jejich esterů byl pozorován nepatrný vliv na změnu aroma ošetřeného vína (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006). Spolehlivě sensoricky rozpoznatelná dávka mastných kyselin se ovšem ukázala až aplikace 30 mg/l (Baroň, 2013a).

Mechanismus fungicidních účinků není příliš známý, přijatelné hypotézy jej vysvětlují tak, že mastné kyseliny jsou propouštěny plasmatickou membránou pasivní difuzí. Jako nedisociované molekuly jsou rozpouštěny fosfolipidy v membráně, a na základě komplexu lipid-lipid a lipid-protein je zvyšována permeabilita. Dochází k akumulaci mastných kyselin v cytoplazmě, poklesu selektivní kapacity membrány, a tím nemohou být proti koncentračnímu spádu akumulovány další složky jako aminokyseliny a ribosa. Jakmile jsou kyseliny uvnitř buňky, dochází k jejich disociaci a nárůstu interceluární protonové koncentrace, která je zodpovědná za hodnotu pH. Studie ukázaly, že kyselina oktanová a kyselina dekanová jsou pro kvasinky toxické, a to především při nízkém pH. Dále bylo zjištěno, že toxicita je vyšší při aplikaci obou kyselin, než při ošetření jednotlivými kyselinami. K ošetření vína může být použita také kombinace šesti-, osmi- a desetiuhlíkatých kyselin, přičemž každá z nich bude v dávce 3 mg/l. Ky-

selina s šesti uhlíky se nazývá kyselina hexanová (kyselina kapronová), (Delfini et al., 2001).

Praktické využití ve větším měřítku je nyní testováno. Na základě uděleného národního patentu a schválení mezinárodní organizací pro révu a víno (OIV) a státní zemědělské a potravinářské inspekce (SZPI) se v České republice rozběhl tříletý testovací provozní program na metodu použití vyšších mastných kyselin v technologii vína. V prvním roce 2012 bylo otestováno přibližně 70 000 litrů vína v malých, středních i velkých vinařských podnicích. Výsledky tohoto programu budou zpracovány ve formě reportu a předneseny komisi expertů OIV v Bruselu. Cílem testovacího programu je získání komplexního náhledu na chování těchto látek při aplikaci ve vinařské technologii, otestování metody v reálných podmínkách vinařských podniků, získání širších znalostí a souvislostí o účinnosti vyšších mastných kyselin v různých stádiích výroby vína a jejich dopadu na finální produkt. Nedílnou součástí výzkumu je také snaha o zavedení metody s vyššími mastnými kyselinami jako povolené enologické praktiky a možnost komerčního využití po případném prodeji licenčních práv. V roce 2013 byl národní patent rozšířen na evropský patent a patent přihlášený v Republice Jižní Afrika (Baroň, 2013a). V Evropě je tato metoda chráněna patentem EP2681301 A2 (Baroň et al., 2014).

### 3.4.5 Lysozym

Lysozym je krystalická bílkovinná látka, která se přirozeně vyskytuje ve slinách, vaječném bílku i mateřském mléce. Tato látka byla poprvé popsána v roce 1922 objevitelem penicilinu, Sirem Alexandrem Flemingem. Mnoho let se lysozym v potravinářství používá ke konzervaci tvrdých sýrů. Tato látka je navrhována jako enologický prostředek alternativní k oxidu siřičitému (Delfini *et al.*, 2001).

Lysozym je enzym schopný likvidace Gram pozitivních bakterií, jako jsou bakterie mléčného kvašení. Působením lysozymu dochází k lyzi buněčných stěn a následně úhynu buňky. Bylo zjištěno, že nemá antimikrobiální vlastnosti vůči Gram negativním bakteriím, jako jsou například octové bakterie (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006), ani proti kvasinkám (Delfini *et al.*, 2001). Účinnost lysozymu je také velmi snižována dodáním bentonitu a SO<sub>2</sub> (Delfini *et al.*, 2001).

Přídavek lysozymu v jednorázové dávce 500 mg/l do moštu, nebo ve dvou dávkách 250 mg/l do moštu, a následně 250 mg/l do mladého vína, se ukázal jako velmi pozitivní ke snížení potřebné dávky SO<sub>2</sub>, dodávaného z důvodu inhibice jablečno-

mléčného kvašení bílého vína. Při takovéto dávce nebyla ovlivněna ani rychlost alkoholové fermentace, ani gustatorický projev vína (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006).

Dalším vhodným využitím lysozymu v enologii se jeví aplikace při výrobě červených vín metodou karbonické macerace, kde je zapotřebí oddálení malolaktické fermentace. Lysozym v dávce 10 g/hl aplikovaný na pomleté hrozny má stejnou efektivitu proti riziku volatilní acidity jako zasiření 5 – 7 g/hl (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006).

Jednou z možností je použití při výrobě vína, kde je předpoklad pomalejší fermentace. Lysozym v tomto ohledu zabraňuje případné dominanci mléčných bakterií nad kvasinkami, a tím omezuje riziko předčasného zastavení alkoholové fermentace. Nežádoucí rozvoj bakterií je možné kontrolovat 200 – 300 mg/l lysozymu. Komplementární využití lysozymu (dávka 25 g/hl) je patrné i z hlediska snížení počáteční populace bakterií z několika milionů na řády stovek jedinců. Dodáním lysozymu ovšem není možné zajistit ochranu proti refermentaci vín s vysokým zbytkovým cukrem, ani antibakteriální stabilitu vůči octovým bakteriím, které způsobují volatilní aciditu (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006).

#### 3.4.6 Nisin

Nisin je látka s antimikrobiálními účinky, která je v potravinářství označována jako konzervant E234. Z chemického hlediska patří mezi polypeptidy a je tvořen 34 aminokyselinami, v jeho molekule je pět vazeb disulfidických můstků, které mají za následek vyšší termickou stabilitu v kyselém prostředí. Poprvé byl nisin izolován z bakterie *Streptococcus lactis*. Jeho antimikrobiální vlastnosti, především vůči Gram pozitivním bakteriím, jsou vyšší při nižším pH (Delfini *et al.*, 2001). Tato látka se řadí mezi bakteriociny, látky inhibující bakterie. Působením dochází ke vzniku pórů v cytoplazmatické membráně a odtoku esenciálních látek. Některé kmeny bakterií mají vyšší odolnost, proto jsou účinky nadále zkoumány (Baroň, 2013a).

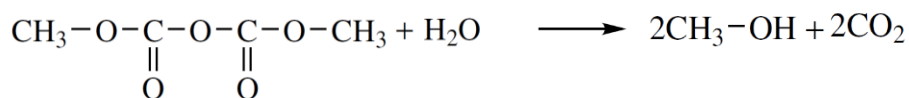
#### 3.4.7 Dimetyldikarbonát

Dimetyldikarbonát (Obr. 14) je potravinové aditivum s označením E242. Tato látka (zkratka DMDC) byla v roce 1990 vyhodnocena Vědeckým výborem pro potraviny jako vhodná k chladové sterilizaci nealkoholických nápojů a džusů v dávce nepřevyšující 250 mg/l. Nařízení Evropské komise z roku 1995 povolilo používání DMDC jako konzervační látky nealkoholických aromatizovaných nápojů, nealkoholických vín a

kapalných čajových koncentrátů v maximální koncentraci 250 mg/l (Vědecký výbor pro potraviny, 2001).

Historický vývoj nám také ukazuje použití chemicky podobných látek dietyldi-karbonátu (DEDC) a etyl pyrokarbonátu s obchodním označením Baycovin. DEDC jako aditivum bylo na několik roků povoleno v sedmdesátých letech 20. století v USA a Německu, díky své fungicidní aktivitě proti kvasinkám. DEDC byl velmi efektivní v dávkách několika stovek miligramů na litr při lahvování, avšak v průběhu skladování jeho účinnost klesala. V případě etyl pyrokarbonátu se postupem času zjistilo, že jeho vedlejší reakce se složkami vína (organickými kyselinami, polyfenoly a dusíkatými látkami) vedou ke vzniku toxických látek, i když v koncentracích pod prahovou hodnotou (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006).

Z výše popsaných důvodu firma Bayer, výrobce přípravku Baycovin, nahradila tento preparát dimetyldikarbonátem s obchodním označením Velcorin. Pokusy ukázaly, že tato látka v dávce 100 mg/l je schopna dokonale sterilizovat víno při hodnotě pH 3,8 bez dodání SO<sub>2</sub>, a to i v případě počáteční populace kvasinek více než 10<sup>7</sup> buněk na litr. Prvotně byla tato látka povolena v USA a až následně v dalších státech. Použití DMDC je velmi efektivní před lahvováním, i když je možné jej použít i k zastavení fermentace sladkých botrytických vín. Aplikací tohoto enologického přípravku je možné snížit potřebnou dávku SO<sub>2</sub>, avšak nízká dávka síření je zapotřebí z hlediska ochrany proti oxidaci (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006). DMDC se hydrolyzou rozkládá na metanol a oxid uhličitý. Jak je popsáno na obrázku níže (Obr. 5). Právě toxický metanol je předmětem sporu zda je možné toto aditivum používat.



**Obr. 5** Hydrolyza dimetyldikarbonátu za vzniku metanolu a oxidu uhličitého (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006)

Jak vyplývá z prohlášení Vědeckého výboru pro potraviny z roku 2001, aplikací 200 mg/l DMDC přibude ve víně 98 mg/l metanolu. Přirozeně víno obsahuje průměrně 140 mg/l metanolu. Organismus zdravého člověka je schopen metabolizovat 1500 mg metanolu za hodinu bez jakýchkoliv fyziologických potíží, což je řádově více než 238 mg/l u vína ošetřeného DMDC při dávce do 200 mg/l. Z tohoto vyplývá, že i konzuma-

ce většího množství vína by neměla být zdravotním rizikem. Shrnutím debatovaných problémů došel Vědecký výbor pro potraviny k závěru, že používání DMDC k ošetření alkoholických nápojů, tedy i vína, nepřináší větší zdravotní rizika než používání této látky v nealkoholických nápojích (Vědecký výbor pro potraviny, 2001). Prohlášení bylo klíčové v procesu autorizace tohoto enologického přípravku na území Evropské unie. DMDC je v současné době v Evropě povoleno přidávat v maximální dávce 200 mg/l při lahvování vín s vyšším obsahem zbytkového cukru než 5 g/l, jak vyplývá z vyhlášky Evropské komise z roku 2006 (Baroň, 2013a).

Dimetyldikarbonát (DMDC) představuje silnou antimikrobiální látku, jejíž maximální inhibiční účinek nastane již brzy po jejím přidání. Po aplikaci inhibuje stěžejní glykolytické enzymy, zejména alkohol dehydrogenázu a glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenázu. Výhodou preparátu může být nízká závislost účinnosti na pH (Baroň, 2013a).

Fungicidní účinky proti kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae* aplikovaného DMDC v koncentraci 100 mg/l byly zkoumány na Ústavu vinohradnictví a vinařství Zahradnické fakulty MENDELU v Brně. Výzkum ukázal okamžité zastavení alkoholové fermentace. Ošetřené víno po aplikaci začalo rapidně ztrácet zákal a kolonie kvasinek rychle sedimentovaly na dně nádoby (Baroň, 2013a).

Účinek DMDC je pouze dočasný, proto opětovnou inokulací lze naočkovat víno či mošt požadovaným kmenem kvasinek. Platí také obecné pravidlo, že odolnější jsou bakterie než kvasinky (Baroň, 2013a).

Velmi účinným se ukázalo použití DMDC k ošetření botrytických vín, jelikož dochází k rapidnímu poklesu potřeby síření v průběhu skladování (Baroň, 2013a).

#### 3.4.8 Natamycin

Natamycin neboli pimaricin je látka s fungicidními účinky povolená ke konzervaci tvrdých sýrů. Její aktivita spočívá ve změně permeability buněčné membrány, což by bylo možné využít k zastavení alkoholové fermentace a ke kontrole antimikrobiální stability vína. Jako antibiotikum je lokálně povolena ve vínech Jižní Afriky, ta ovšem nesmějí být vyvážena. V Austrálii, USA ani Evropské unii tato látka není schválena jako enologické aditivum a proto je zakázáno pimaricin pro tento účel používat a taktéž dovážet vína s jeho obsahem (Delfini *et al.*, 2001), (Oelovse *et al.*, 2010).



### 3.4.9 Koloidní stříbro

Koloidní stříbro neboli komplex koloidního stříbra (zkratka CSC z anglického Colloidal Silver Complex) se pro své antimikrobiální vlastnosti používalo již ve starověku. Po objevení penicilinu Alexandrem Flemingem se začala používat antibiotika a došlo k úpadku používání CSC. Později byly objeveny rezistentní kmeny kvasinek, a proto se použití CSC, především v podobě nanočástic, stalo perspektivním. Bylo zjištěno, že nanomateriály s obsahem stříbra jsou antimikrobiální k širokému spektru Gram negativních a Gram pozitivních bakterií. CSC má rovněž jisté antimykotické a antivirové vlastnosti, čehož se dnes využívá také v lékařství (Baroň, 2013a).

Mezi nejdůležitější mechanismy účinku CSC patří především přerušení tvorby ATP, přerušení replikace DNA, přímé porušení buněčných membrán nanočásticemi a tvorba reaktivních forem kyslíku. Bylo dokázáno, že aplikace 1 g CSC na 1 kg hroznů funguje jako účinné antiseptikum, které je schopno kontrolovat vývoj octových i mléčných bakterií, zatímco rozvoj *Saccharomyces cerevisiae* není nijak narušen. Při použití CSC dochází také ke změnám obsažených látek. Vína vykazují nižší obsah alkoholu a acetaldehydu, v porovnání s víny, která jsou ošetřena ve fázi zpracování jen SO<sub>2</sub>. Výsledky naznačují, že přítomnost CSC modifikuje metabolismus kvasinek, jenž vede ke snížené produkci etanolu oproti vínům ošetřeným SO<sub>2</sub>. Vína ošetřované CSC navíc nevykazovala oproti vínům s SO<sub>2</sub> přílišné odchylky v chemických a senzoryckých vlastnostech, tedy až na jistou náchylnost bílých vín k oxidaci. CSC se proto jeví, jako perspektivní antiseptikum pro vinařský průmysl, jehož hlavní nevýhodou je nedostatek antioxidační aktivity, který by měl být brán v úvahu při jeho aplikaci. Tento nedostatek by mohl být kompenzován kombinací s jinou antioxidační látkou například kyselinou askorbovou (Baroň, 2013a).

## 4. DISKUSE

Problematika ošetření vína a zachování jeho dobrého zdravotního stavu není pouze aktuálním tématem. Dobré a chutné víno chtěli lidé pít už od té doby, co ho začali vyrábět. Ovšem pojem „dobré či chutné víno“ se s vývojem výrobních postupů, dostupnosti ošetřujících prostředků, klimatickými podmínkami, společenským postavením a znalostmi velmi měnil. Řekl bych, že dnešní konzument by určitě nepochválil vína, která vznikla v dávné Gálii a nevhodným skladováním a ošetřením naprosto ztratila na chuti a byla jistě plná vad.

V současné době se ošetření vína proti vadám a výběr vhodné technologie výroby pokládá za samozřejmé. Kromě pár tradičních postupů výroby vína, jako je víno Ret-sina nebo vína z Kvevrů, se za hlavní konzervační látku považuje oxid siřičitý. Jak bylo v mojí bakalářské práci popsáno, je to velmi polyvalentní konzervant, který může zabránit mnoha nepříjemným rizikům. Avšak jeho antiseptické vlastnosti, ochrana proti oxidázám a další funkce sebou přinášejí také zdravotní rizika pro konzumenty vína. Z tohoto důvodu je v první řadě důležitá legislativa, která jasně stanovuje maximální přípustné koncentrace oxidu siřičitého, a případná porušení jsou penalizována. Dalším důležitým krokem je hledání komplementárních metod, které mohou nahradit dávky oxidu siřičitého.

Možné komplementární metody popisuje tato práce. Některé metody jsou teprve v počátcích testování a před procesem autorizace, jiné jsou již v praxi používané. Mezi běžně používané postupy už patří aplikace inertních plynů, cross-flow filtrace, malolaktická fermentace i technologie *sur-lie*. V případě použití alternativních metod k oxidu siřičitému je důležitá znalost, zda se tento postup hodí na konkrétní víno s ohledem na jeho cukernatost, pH a podobně. Některé metody, jako například *sur-lie* a malolaktická fermentace, se vzájemně velmi dobře doplňují, a pokud jsou pro jejich provedení příznivé podmínky, mohou značně snižovat celkový obsah oxidu siřičitého. Dávku oxidu siřičitého k zastavení alkoholového kvašení sladkých vín lze například kompenzovat mastnými kyselinami (kyselina dekanová, kyselina oktanová), ale na druhou stranu na tento postup není vhodné použití kyseliny sorbové. Ta se hodí ke konzervaci vín s nízkým pH, avšak v kombinaci s oxidem siřičitým, který plní funkci antioxidantu. Cross-flow filtrace je vhodným prostředkem k zastavení alkoholové fermentace, a pokud ji budeme před lahvováním používat v kombinaci s inertními plyny, dojde ke kýže-

nému snížení potřeby oxidu siřičitého. Nevýhodou cross-flow filtrace je vysoká pořizovací cena, která omezuje využitelnost jen na střední a velké vinařské podniky. Avšak v dnešní době je možné i jednorázové zapůjčení od firem, které tuto službu nabízejí. Některé z metod mají i druhotné pozitivum než jen nahrazení oxidu siřičitého. Mezi takové výhody může patřit organoleptické zlepšení, snadnější extrakce fenolických látek a podobně.

Mnoho z probíraných metod je zapotřebí podrobněji studovat a najít optimum jejich použití. Řada metod se jeví perspektivně (mastné kyseliny, kyselina askorbová, fyzikální metody), a pokud se odborná veřejnost o nich dozví, mohou být testovány na mnohem rozsáhlejším zkušebním panelu. Dle mého názoru by mohlo být v budoucnu velké množství fyzikálních metod, jako jsou pulzní elektrické pole, světelné pulzy, ultrazvuk a ultrafialové záření, nabízeno formou služby, jak je tomu u cross-flow filtrace.

## 5. ZÁVĚR

V mojí bakalářské práci je pojednáváno o oxidu siřičitém ve spojitosti s enologií. Samotný úvod je náhledem do historie šíření a ošetřování vína jinými způsoby. Hlavní část se věnuje literárnímu přehledu současných poznatků použitelných k ochraně a zpracování vína s ohledem na požadovanou kvalitu vína.

Z počátku se práce věnuje chemismu oxidu siřičitého, jeho dávkování ve vinařství a v neposlední řadě zdravotním rizikům, která přináší manipulace a konzumace vín s obsahem této chemické látky. V práci se též hovoří o formách a funkci oxidu siřičitého obsaženého ve víně. Těmito formami jsou volný, vázaný, endogenní a celkový oxid siřičitý. K důležitým funkcím, které šíření přináší, patří zejména ochrana proti oxidázám, mikrobiální stabilizace a zamezení nežádoucí oxidaci.

Dále práce pojednává o metodách, které by mohly být za určitých podmínek komplementární k dávkování oxidu siřičitého. Tyto metody jsou rozděleny do třech kategorií. První z možností snížení dávek oxidu siřičitého jsou technologické postupy, jakými jsou jablečno-mléčné kvašení, tangenciální filtrace a *sur-lie*. Následně jsou rozebrány některé fyzikální metody, mezi nimiž bych jmenoval pasteraci, ultrafialové záření, působení pulzního elektrického pole a vysoký hydrostatický tlak. Třetí z možností částečného nahrazení oxidu siřičitého je aplikace jiných chemických látek. Chemickými metodami, o kterých práce hovoří, jsou například: použití inertních plynů, aplikace lysozymu, dimetyldikarbonátu, kyseliny askorbové a mastných kyselin.

Závěrečná část práce se věnuje diskusi a vlastnímu komentáři dané problematiky.

## 6. SOUHRN a RESUME

### *Komplementární metody k dávkování oxidu siřičitého*

Tato bakalářská práce pojednává o komplementárních metodách, které by mohly snížit potřebné dávky oxidu siřičitého k ošetření vína. Počáteční část pojednává o chemismu oxidu siřičitého, jeho formách a účincích ve víně. Práce popisuje zdravotní rizika oxidu siřičitého v enologii a jeho dávkování ve vinařství. Dále je tato práce zaměřena na technologické způsoby snížení celkového oxidu siřičitého, fyzikální metody omezení dávkování oxidu siřičitého a chemické látky, které mohou být komplementární k oxidu siřičitému v enologii. Ve své práci jsem se snažil popsat možné metody pro snížení potřebných dávek SO<sub>2</sub>.

**Klíčová slova:** oxid siřičitý, víno, kvasinka, bakterie

### *Complementary methods for sulphur dioxide dosage*

This thesis discusses complementary methods that could reduce the required dosage of sulfur dioxide treating wine. The initial section discusses the chemistry of sulfur dioxide, its forms and effects in wine. The thesis describes the health hazards of sulfur dioxide in oenology and its dosage in winemaking. Furthermore, this work focuses on the technological methods of reducing total sulfur dioxide, physical methods reducing sulfur dioxide dosage and chemicals that may be complementary to sulfur dioxide in oenology. In my thesis I have tried to describe the possible methods for reducing the necessary doses of SO<sub>2</sub>.

**Keywords:** sulphur dioxide, wine, yeast, bacteria

## 7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

BAROŇ, M, M. KUMŠTA a P. BÁBÍKOVÁ, 2014. Composition of saturated fatty acids and its use for inhibition of alcoholic or malolactic fermentation and dose reduction of sulphur dioxide in wine making technology [online]. 2014. B.m.: Google Patents. Dostupné z: <http://www.google.com/patents/EP2681301A2?cl=en>

BAROŇ, M, 2013. FOLIA UNIVERSITATIS AGRICULTURAE ET SILVICULTURAE MENDELIANAE BRUNENSIS: *Možnosti snížení oxidu siřičitého ve vínech révy vinné*. 1. Mendelova univerzita v Brně. ISBN 978-80-7375-986-5. ISSN 1803-2109.

BARTOWSKY, E J, 2009. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. Letters in Applied Microbiology [online]. B.m.: Blackwell Publishing Ltd, roč. 48, č. 2, s. 149–156. ISSN 1472-765X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02505.x

CULLEN, P, Brijesh K TIWARI a Vasilis P VALDRAMIDIS. Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods. 1st ed. Waltham, MA: Academic, 2012, xvi, 526 p. Food science and technology international series. ISBN 0123814707.

DELFINI, Claudio a Joseph V FORMICA. Wine microbiology: science and technology. New York: Marcel Dekker, c2001, 490 s., [8] p. of plates. ISBN 0-8247-0590-4.

GREENWOOD, N, František JURŠÍK a Alan EARNSHAW. Chemie prvků. 1. vyd. Praha: Informatorium, 1993, 793 s. ISBN 8085427389.

KOSSEVA, Maria R., John F. KENNEDY a Bernard DONÈCHE. Handbook of Enology Volume 2 The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, c2006-, 2 v. ISBN 10.1002/0470010398.

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

PAVLOUŠEK, Pavel. Výroba vína u malovinařů. 2. aktualizované a rozšířené vydání. Praha: Grada publishing, 2010, 120 s. ISBN 978-80-247-3487-3.

PUÉRTOLAS, E., N. LÓPEZ, S. CONDÓN, I. ÁLVAREZ, J. RASO, G. GUELACHVILI, G. GUELACHVILI, G. GUELACHVILI, K. Narahari RAO, et

al. Potential applications of PEF to improve red wine quality: Quartic Potential Energy Function (PEF) in internal coordinates [online]. ISBN 10.5772/37746.

RIBÉREAU-GAYON, Pascal, Denis DUBOURDIEU a Bernard DONÈCHE. Handbook of enology [online]. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, c2006-, 2 v. ISBN 04-700-1037-1.

SANTOS, Mickael C, Cláudia NUNES, João CAPPELLE, Fernando J GONÇALVES, Ana RODRIGUES, Jorge A SARAIVA a Manuel A COIMBRA, Effect of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free red wine. ISBN 10.1016/j.foodchem.2013.05.022.

### **Internetové zdroje:**

[http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina\\_jablečná](http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_jablečná)

[http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina\\_mléčná](http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_mléčná)

<https://www.dtest.cz/ecka/69/sorban-draselny>

[is.muni.cz/th/371935/pedf\\_b/Aditiva\\_v\\_potravinach](http://is.muni.cz/th/371935/pedf_b/Aditiva_v_potravinach)

<http://cs.wikipedia.org/wiki/Pasterizace>

<http://www.santarosa.edu/~jhenderson/Sulfur%20Dioxide.pdf> (Santa Rosa Junior College, 2014)

[http://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty2/vseo/stranka.php?kod=1189](http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=1189) (Mendelu, 2013)

<http://www.vinicavino.sk/sk/technologie/malolakticka-fermentace/> (Baroň, 2013b)

[http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/winebacteria/oenococcus\\_oeni.html](http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/winebacteria/oenococcus_oeni.html) (University of California)

<http://www.oiv.int/oiv/cms/index?lang=en>

[http://biomikro.vscht.cz/vyuka/bm/Antimikrobiální\\_latky.pdf](http://biomikro.vscht.cz/vyuka/bm/Antimikrobiální_latky.pdf)  
<http://viticulture.hort.iastate.edu/info/06iawgmtg/oxidationso2mgt.pdf> (Murli et al., 2006)

[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out96\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out96_en.pdf) (Vědecký výbor pro potraviny, 2001)

<http://www.winetech.co.za/docs2010/NatamycinNewsletter.pdf> (Oelovse *et al*, 2010)

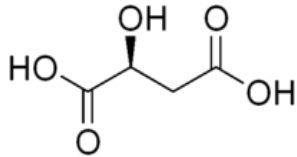
[http://issuu.com/vinarsky\\_obzor/docs/vo\\_7-8\\_2013](http://issuu.com/vinarsky_obzor/docs/vo_7-8_2013)

[http://issuu.com/vinarsky\\_obzor/docs/vyber\\_11-2013/6](http://issuu.com/vinarsky_obzor/docs/vyber_11-2013/6)

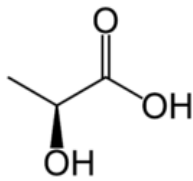
<http://fbissson.ucdavis.edu/lecture.htm> (Bisson, 2001)

## 8. PŘÍLOHY

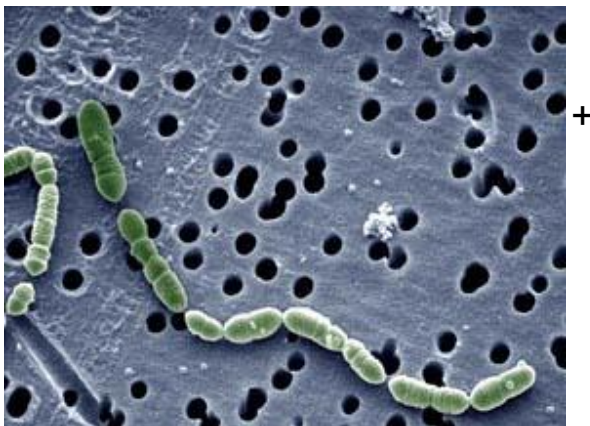
### 8.1 Obrázky



**Obr. 6** Vzorec kyseliny L-jablečné (2-hydroxybutandiové),  
([http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina\\_jablečná](http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_jablečná))

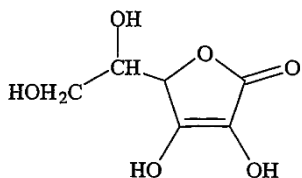


**Obr. 7** Vzorec kyseliny L-mléčné (2-hydroxypropanové),  
([http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina\\_mléčná](http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_mléčná))

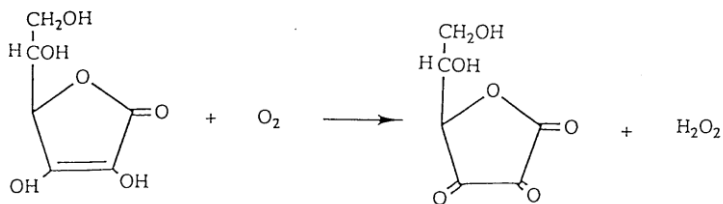


**Obr. 8** Obrázek bakterie *Oenococcus oeni* (University of California)

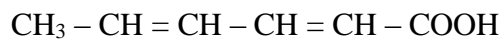




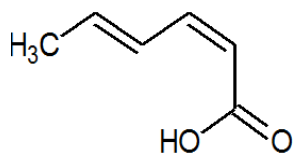
**Obr. 9** Vzorec kyseliny askorbové



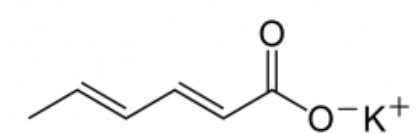
**Obr. 10** Reakce kyseliny askorbové s kyslíkem na kyselinu dehydroaskorbovou a peroxid vodíku (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006)



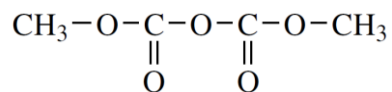
**Obr. 11** Vzorec kyseliny sorbové



**Obr. 12** Vzorec *trans-trans* izomeru kyseliny sorbové



**Obr. 13** Vzorec sorbátu draselného (<https://www.dtest.cz/ecka/69/sorban-draselny>)



**Obr. 14** Vzorec dimetyldikarbonátu (Ribéreau - Gayon *et al.*, 2006)

## 8.2 Seznam použitých zkratk

$\mu\text{g}/\text{m}^3$	- mikrogram na metr krychlový
ATP	- adenosintrifosfát
BOK	- biologické odbourání kyselin
$\text{CO}_2$	- oxid uhličitý
CSC	- komplex koloidního stříbra (Colloidal Silver Complex)
č.	- číslo
DEDC	- dietyldikarbonát
DMDC	- dimetyldikarbonát
DNA	- deoxyribonukleová kyselina
$e^-$	- elektron
$\text{Fe}^{2+}$	- železnatý kation
$\text{Fe}^{3+}$	- železitý kation
$\text{g}/\text{hl}$	- gram na hektolitr
$\text{g}/\text{kg}$	- gram na kilogram
$\text{g}/\text{l}$	- gram na litr
$\text{H}^+$	- vodíkový kation
$\text{H}_2\text{O}$	- voda
HHP	- vysoký hydrostatický tlak (High Hydrostatic Pressure)
$\text{HSO}_3^-$	- hydrogensířičitanový anion
K	- Kelvin
$\text{kHz}$	- kilohertz
$\text{kJ}/\text{kg}$	- kilojoule na kilogram
$\text{kV}/\text{cm}$	- kilovolt na centimetr
$\text{l}/\text{hl}$	- litr na hektolitr
$\text{l}/\text{min}$	- litr za minutu

LD <sub>50</sub>	- smrtelná dávka pro 50% populace
lx/s	- lux za sekundu
m/s	- metr za sekundu
mg/kg/d	- miligram na kilogram a na den
mg/l	- miligram na litr
MLF	- malolaktická fermentace, jablečno-mléčné kvašení
MPa	- megapascal
ms	- milisekunda
N <sub>2</sub>	- molekula dusíku
nm	- nanometr
OIV	- Organizace pro víno a révu
PbO	- oxid olovnatý
PEF	- pulzní elektrické pole (Pulsed Electric Field)
pm	- pikometr
ppm	- pairs per milion odpovídá centimetru krychlovému na metr krychlový
SO <sub>2</sub>	- oxid siřičitý
SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	- siřičitanový anion
SZPI	- Státní zemědělská a potravinářská inspekce
USA	- Spojené státy Americké
UV	- ultrafialové záření
W	- watt