

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra pedologie a ochrany půdy



**Možnost stanovení organických kyselin ve víně pomocí
iontově výměnné chromatografie**

Diplomová práce

Bc. Karolína Parobková

Kvalita a zpracování zemědělských produktů (AMK)

RNDr. Václav Tejnecký, Ph. D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Možnost stanovení organických kyselin ve víně pomocí iontově výměnné chromatografie" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11.4.2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala mému vedoucímu RNDr. Václavu Tejneckému, Ph.D., konzultantovi doc. Ing. Onřejovi Drábkovi, Ph.D. a Ing. Petře Křížové za jejich čas, trpělivost a cenné rady. Ráda bych poděkovala také Ing. Janu Stávkovi, Ph.D. za jeho ochotu a poskytnuté vzorky vína.

Možnost stanovení organických kyselin ve víně pomocí iontově výměnné chromatografie

Souhrn

Víno je místem neustále se měnících biochemických reakcí. Koncentrace organických kyselin je každý rok, v každé odrůdě a při různých technologických zpracování jiná. Veškeré kyseliny vyskytující se ve víně ovlivňují výslednou chuť, zbarvení i vůni. Monitoring minoritně přítomných organických kyselin je stejně tak důležitý jako těch hlavních. Kromě vlivu na organoleptické vlastnosti vína mají kyseliny také konzervační účinek. Nadlimitní hodnoty koncentrací těchto látek, způsobené špatnými technologickými postupy během zpracování nebo díky nemoci hroznů, vedou k nežádoucímu profilu vína, a mohou zapříčinit zdravotní problémy.

Celkově bylo analyzováno šest vzorků bílých vín stejné odrůdy ze Stávkova vinařství na začátku vinifikace, tři vzorky hotových bílých vín a jeden vzorek červeného hotového vína. Cíl stanovit a kvantifikovat nízkomolekulární organické kyseliny ve vybraných odrůdách bílého vína pomocí iontově výměnné chromatografie byl splněn.

Iontově výměnná chromatografie je separační metodou, která dokáže separovat a kvantifikovat látky díky jejich iontovému náboji. U kyselin s totožnou velikostí náboje docházelo k překryvu (koeluci) píků, neboť opouštěly kolonu ve stejném retenčním čase. Kyseliny se stejným retenčním časem nebylo možno bez použití hmotnostního detektoru od sebe odlišit. Kyseliny shikimátová/glykolátová/octová; kyseliny oxaloacetátová/pyrohroznová; kyseliny glutarátová/slizová/adipová; kyseliny jantarová/jablečná; kyseliny vinná/malonová; kyseliny šťavelová/fumarová a kyseliny ftalátová s fosforečnany byly určeny jako koeluované. Tyto kyseliny byly rozlišeny na základě vědeckých prací zabývajících se touto problematikou a předpokládaným složením vína.

Hypotéza, že minoritně přítomné organické kyseliny ovlivňují organoleptické vlastnosti vína, byla potvrzena. Rozdílné hladiny kyselin bylo možno pozorovat u všech vín. Analyzovaná vína se od sebe sensoricky lišila. U Stávkových vín, kdy každý vzorek zrál v odlišných nádobách s použitím různých kvasinek, byly rozdíly nejpatrnější.

Klíčová slova: víno; organické kyseliny; iontově výměnná chromatografie; organoleptické vlastnosti vín

Positively of organic acid determination by means of ion exclusion chromatography in wine

Summary

Wine is the place of ever-changing biochemical reactions. Concentration of organic acids is every year, in every variety different, and it also depends on a specific technology used while processing the wine. All acids present in wine influence its final taste, colouring and bouquet. Monitoring of organic acids that have minority presence is as important as the one of the essential acids. The acids have, besides affecting the organoleptic properties of wine, also a preservative effect. The excessive limits of concentration of these substances caused by incorrect technological procedures during processing or due to the grape disease can lead to undesirable wine profile and cause health issues.

In total six specimens of white wine of the same variety from "Stávkovo vinařství" were analysed at the beginning of the vinification and three specimens of white wine and one of red wine after finalizing the winemaking process. The target to determine and quantify low molecular organic acids in selected varieties of white wine by the ion-exchange chromatography has been met.

The ion-exchange chromatography is a separation method that can isolate and quantify substances thanks to their ionic charge. Co-elution of peaks was taking place in the acids with the same size charge since they were separated at the same retention time. The acids with the same retention time could not be distinguished from each other without using the weight detector. Shikimic/glycolic/acetic; oxaloacetic/pyruvic; glutaric/mucic/adipic; succinic/malic; tartaric/malonic; oxalic/fumaric and phthalic acids with phosphorus were specified as coeluted. These acids were distinguished based on scientific researches dealing with this topic and anticipated composition of wine.

Hypothesis, that the organic acids with minority presence influence the organoleptic properties of wine, has been confirmed. All wines showed different levels of acids. The analysed wines demonstrated sensoric differences. The wines from "Stávkovo vinařství", whereby each specimen matured in different tanks/barrels with the use of different yeasts, experienced the most significant changes.

Keywords: wine; organic acids; ion-exchange chromatography; organoleptic traits of wine

Obsah

1. Úvod	8
2. Hypotéza a cíle práce	9
2.1. Hypotéza	9
2.2. Cíle	9
3. Literární rešerše	10
3.1. Chromatografie	10
3.1.1 Kapalinová chromatografie (HPLC).....	11
3.1.2 Plynová chromatografie (GC).....	12
3.1.3 Analýza vzorku	13
3.1.4 Ionově výměnná chromatografie (IC).....	14
3.1.5 Stanovení organických kyselin ve víně pomocí IC	17
3.2. Vinná réva	18
3.2.1 Rozdělení vín	19
3.2.2 Popis vinné révy	20
3.2.3 Pěstování.....	21
3.2.4 Virus a škůdci	22
3.3. Chemické složení hroznů	22
3.3.1 Cukry	22
3.3.2 Fenolické sloučeniny	24
3.3.3 Dusíkaté látky.....	25
3.3.4 Aromatické látky	25
3.3.5 Minerální látky	26
3.3.6 Organické kyseliny ve víně.....	27
3.4. Technologie výroby vína	35
3.4.1 Hrozen.....	35
3.4.2 Odzrnění, lisování a síření hroznů.....	36
3.4.3 Macerace	37
3.4.4 Odkalení moštu	37
3.4.5 Úprava obsahu kyselin	37
3.4.6 Úprava obsahu alkoholu	38
3.4.7 Kvašení	38
3.4.8 Školení a zrání vína	39
4. Metodika	41
4.1. Chromatograf	41
4.2. Standarty	42
4.3. Kalibrační řady	46

4.4. Výpočty	48
4.5. Vzorky vín	49
4.5.1 Vinařství Stávek.....	50
4.5.2 Rulandské šedé (2017).....	50
4.5.3 Ryzlink rýnský (2017)	51
4.5.4 Rucio (2018).....	52
4.5.5 Dornfelder (2015)	52
5. Výsledky	53
6. Diskuze	59
7. Závěr	66
8. Zdroje	67

1. Úvod

Pěstování vinné révy (*Vitis vinifera*), spolu s konzumací jejího výsledného produktu, má v Čechách, a především na Moravě dlouholetou tradici. Víno je ale celosvětově vyráběný nápoj a každé území má své specifické rysy, které následně utvářejí finální podobu vína. Půdní a klimatické podmínky, terroir, způsob pěstování a uchovávání vína nebo procesy zpracování, to jsou všechno faktory (vnitřní, vnější) působící na množství přítomných kyselin a výslednou chuť vína.

Organické kyseliny, včetně těch minoritně zastoupených, významně ovlivňují organoleptické vlastnosti vína a slouží také jako konzervační čidlo. Koncentrace všech kyselin se mění od doby, kdy se začne utvářet hrozen, až do doby, kdy je víno zkonsumováno. Hladiny kyselin nejsou každoročně konstantní, proto je důležité sledovat jejich obsah již od začátku růstu hroznů. Pro docílení harmonické chuti lze víno různými technologickými postupy upravovat, protože nízké nebo naopak vysoké hladiny koncentrací kyselin, vedou k nežádoucí nevyvážené chuti. Hladiny některých kyselin ve víně mají svou určitou, legislativně danou hranici, jejíž překročení může způsobit zdravotní problémy. Nadlimitní množství je obvykle zapříčiněno hnilobou a různými nemocemi hroznů nebo nedovoleným okyselením vína.

Výši koncentrace kyselin můžeme zkoumat mnohými metodami, mezi něž patří i iontově výměnná chromatografie. Tato separační analytická metoda je založená na principu oddělování chemických látek vzhledem k jejich různé velikosti molekul spolu s jejich nábojem. Iontově výměnná chromatografie je vysoce citlivá, selektivní, stabilní a spolehlivá instrumentální metoda. Pro tuto práci bylo použito chromatografu Dionex ICS – 1600 ve spojení s konduktometrickým detektorem. Analyzované vzorky byly především z bílých odrůd hotových vín a z vín v počáteční fázi vinifikace. Z důvodu zanášení analytické kolony není tato metoda podle dostupné literatury zcela vhodná pro analýzu vín červených, proto byl zkoumán pouze jeden vzorek tohoto druhu. Aplikací iontově výměnné chromatografie můžeme odhalovat i pančování vína.

2. Hypotéza a cíle práce

2.1. Hypotéza

Minoritně zastoupené organické kyseliny výrazně ovlivňují organoleptické vlastnosti vín. Tyto kyseliny lze stanovit pomocí iontově výměnné chromatografie.

2.2. Cíle

Stanovit nízkomolekulární organické kyseliny ve vybraných odrůdách bílého vína pomocí iontově výměnné chromatografie. Stanovit speciaci a kvantifikovat minoritně se vyskytující organické kyseliny v různých druzích námi vybraného bílého vína.

3. Literární rešerše

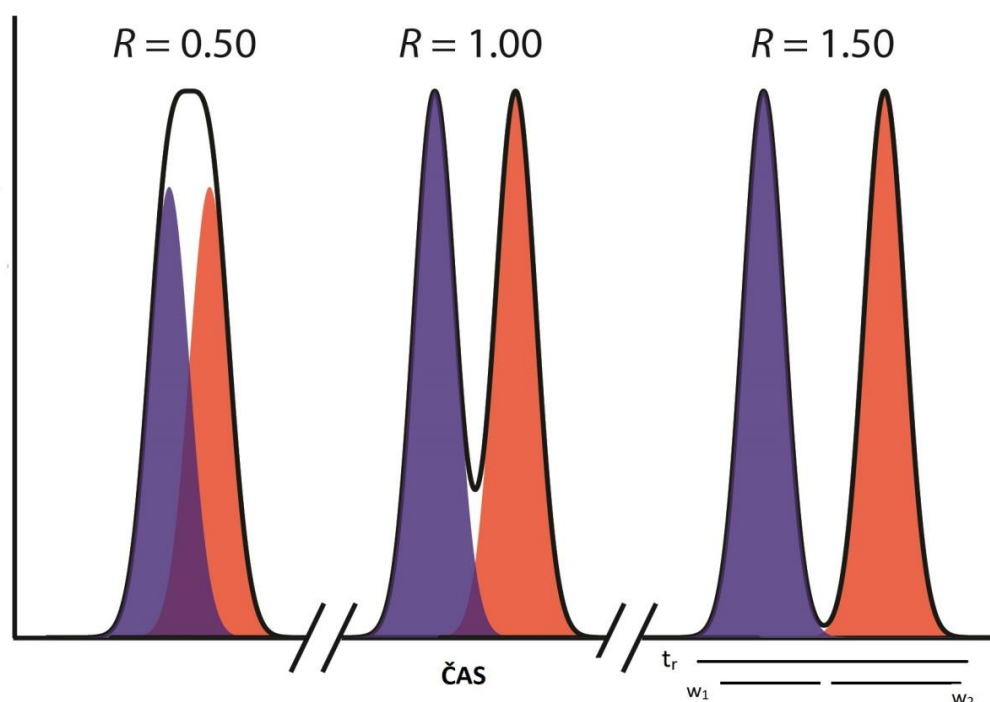
3.1. Chromatografie

Chromatografie je separační analytická metoda, založená na rozdílné distribuci látek mezi dvě fáze – stacionární a mobilní. Obecně ji lze rozdělit podle typu fází (kapalinová, plynová, superkritická aj.), podle uspořádání (sloupcová, papírová, na tenké vrstvě aj.) nebo podle principu dělení (iontová, afinitní, gelová, adsorpční aj.). Chromatografie byla objevena roku 1900 Michaiem Semjonovičem Cvětem během experimentování s rostlinnými pigmenty (Štulík 2004).

Průběh metody je zaznamenán ve chromatogramu chromatografickými píky, které jsou charakteristické Poissonovým rozdělením (náhodná veličina vyjadřující počet výskytů sledovaného jevu v určitém intervalu). Ideální pík by měl být úzký, vysoký a symetrický, což je ovlivňováno mnoha faktory (průtokem mobilní fáze, velikostí částic, materiálem stacionární fáze...). Dva sousední píky považujeme za rozdělené, pokud je jejich míra separace (R) větší než 1,5, viz obrázek jedna. Rovnice pro výpočet míry separace je:

$$R = \frac{t_r}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)}$$

Chromatogram (výstup detektoru × čas) znázorňuje pomocí píku retenční časy látek vyskytujících se ve vzorku. Retenční čas vyjadřuje, jak dlouho je látka vázána na stacionární fázi chromatografu. Na základě toho od sebe látky odlišujeme, následně identifikujeme a můžeme je i kvantifikovat (Harvey 2016).



Obrázek 1: Rozlišení chromatografických píkú

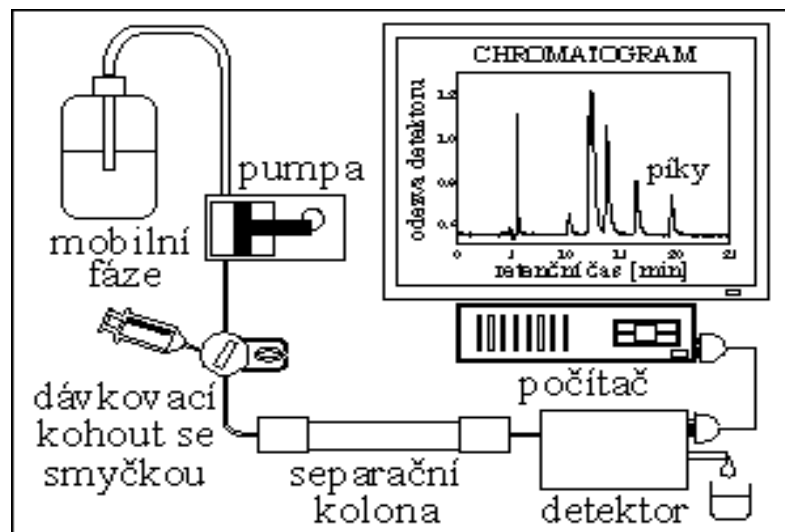
Zdroj: Harvey 2016

3.1.1 Kapalinová chromatografie (HPLC)

Zpravidla se jedná o adsorpční chromatografii, kdy mobilní fázi tvoří kapalina a stacionární fázi náplňová kolona. Jedná se o jednu z nejpoužívanějších separačních metod této doby, je univerzální a dokáže analyzovat široké spektrum látek o různých molekulových velikostech. Rozlišujeme reverzní a normální kapalinovou chromatografii. Reverzní byla využívána spíše v minulosti a vyznačuje se tím, že je její mobilní fáze polární. U normální kapalinové chromatografie je tomu naopak. Podle gradientu mobilní fáze rozdělujeme eluci (vyplavování látek z kolon) na izokratickou (stálý poměr složek mobilní fáze po celou dobu) a gradientovou (postupné navýšování podílu silnějších složek mobilní fáze během analýzy) (Niessen & Tinke 1995).

Kapalinové chromatografie lze modifikovat zvyšováním tlaku (UHPLC), zvyšováním dimenzních separací (dvourozměrné chromatografie) nebo modifikací analyzované látky (superkritická fluidní chromatografie) (Nováková & Vlčková 2009).

Kapalinový chromatograf se skládá z mobilní fáze, vysokotlaké pumpy, dávkovače, kolony, detektoru a počítače se software, který vytváří chromatogram s výsledky, jak můžeme vidět na obrázku dva (Niessen & Tinke 1995).



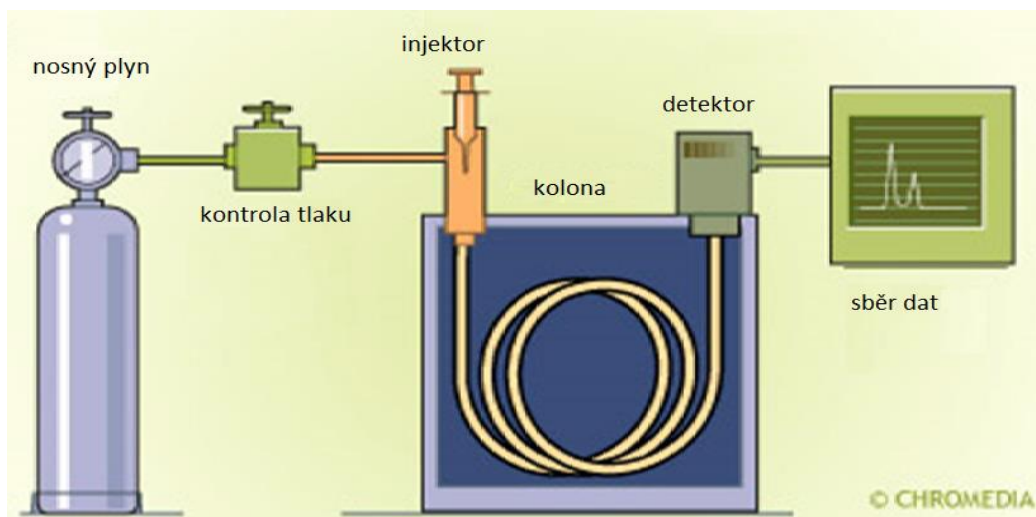
Obrázek 2: Schéma HPLC

Zdroj: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>

3.1.2 Plynová chromatografie (GC)

Základem plynové chromatografie je nosný plyn, který je vůči analyzovanému vzorku inertní. Nejčastěji se jedná o helium, dále to může být dusík (velmi reaktivní) nebo argon. Oproti kapalinové chromatografii používáme plynovou chromatografii pro analýzu plyných vzorků s nižší polaritou, nižší molekulovou hmotností a pro látky těkavé. Těkavé látky lze analyzovat díky technice nazývané headspace, kdy odebíráme odpařující se vzorek v uzavřené nádobě nad kapalinou pomocí tenkého vlákna (Korytář et al. 2002; Caruso & Santoro 2013).

Plynový chromatograf je zobrazen na obrázku tři. Tvoří ho zdroj nosného plynu, nosný plyn, regulátoru průtoku – kontrola tlaku, nástřikový port-injektor, kolona, detektor a počítač vyhodnocující data (Korytář et al. 2002).



Obrázek 3: Plynový chromatograf

Zdroj: www.chromedia.org

3.1.3 Analýza vzorku

Prvním krokem je odebrání dostatečného množství kvalitního vzorku, který homogenizujeme tak, aby docházelo k nejmenším možným ztrátám. Příprava vzorku zahrnuje tzv. purifikaci (očištění), během níž dochází k odstranění pevných částic (filtrace, centrifugace, dekantace aj.), rozdělení látek na základě velikosti molekul (molekulové síto), odstranění látek na základě jejich polarit (rozdělovací koeficient), na základě odlišného náboje (ionexová chromatografie) a na základě afinity látek (imunoafinitivní SPE) (Nováková & Vlčková 2009).

Po extrakci následuje analýza připraveného vzorku pomocí chromatografu. Analyt je unášen mobilní fází do stacionární fáze (kolony), kde je na základě různé afinity jeho jednotlivých částí separován (Giddings & Cazes 2002).

Stacionární fáze představuje pevnou látku (obvykle silikagel) nebo s ní nehybně spojený film kapaliny. Pro separaci velkých molekul, jako jsou tuky nebo bílkoviny, je použití monodisperzních stacionárních fází výhodnější. Představuje dobrý výkon i při vysokých průtokových rychlostech s krátkou regenerační dobou. Na druhé straně, polymerní stacionární fáze jsou odolnější vůči tlaku a extrémnímu pH, ale mají zpravidla nižší účinnost (Oberbeckmann-Winter 2018).

Díky detektoru získáme výsledky převáděné na již zmíněné píky, které rozdělujeme na základě jejich retenčních časů. Je nutné podotknout, že chromatografie je pouze separační metodou, nikoliv detekční (Giddings & Cazes 2002).

Selektivitu spolu s retencí látky lze ovlivnit volbou mobilní fáze, stacionární fáze a teplotou. Účinnost metody ovlivňuje délka kolony, průtok a velikost částic (Nováková & Vlčková 2009).

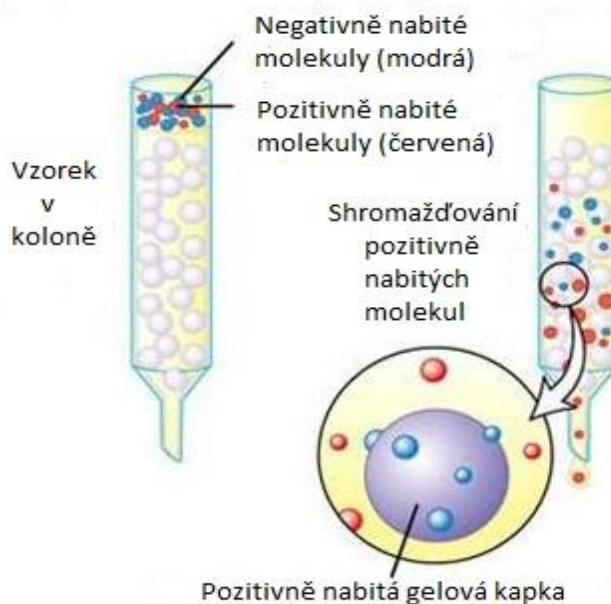
3.1.4 Iontově výměnná chromatografie (IC)

Iontově výměnná chromatografie (IC) zůstává jednou z nejsilnějších instrumentálních technik pro stanovení anorganických aniontů a organických kyselin v různých vzorcích z životního prostředí, jako jsou přírodní voda, sníh, déšť, vzduch, kyselé deště nebo znečištění vzduchu ve formě fluoridů a chloridů pocházejících z různých průmyslových procesů. Pro tyto a mnoho dalších důvodů je důležité sledovat úroveň organických a anorganických látek v různých oblastech životního prostředí. Použití iontově výměnné chromatografie nabízí řadu výhod, jako je vysoká citlivost, selektivita, stabilita, možnost vysokého množství stanovení a spolehlivost (Krata et al. 2009).

Iontově výměnná chromatografie patří mezi kapalinové chromatografie, založené na principu separace chemických látek vzhledem k jejich odlišné velikosti molekul a náboje, kdy mezi sorbentem a analytem působí elektrostatické interakce (Štulík 2004). Můžeme ji aplikovat při separaci polypeptidů, proteinů, polynukleotidů nebo nukleových kyselin. Díky její vysoké kapacitě, jednoduché použitelnosti a vysokému rozlišení lze iontově výměnnou chromatografii použít také v potravinářských odvětvích nebo ve zdravotnictví. IC konkrétně aplikujeme např. při separaci a čištění krevních složek, odsolování vody, rafinaci cukrů, kontrole kvality a bezpečnosti potravin, odstraňování proteinů a dalších vysoce nabitých látek ze vzorků nebo při identifikaci a určování množství kyselin obsažených ve víně, ovocných šťávách a džusech (Cheriyedath 2016).

Iontově výměnná chromatografie využívá interakce mezi nabitými molekulami zkoumané látky (mobilní fáze) a opačně nabitou stacionární fází chromatografu. Stacionární fází v tomto případě představuje ionex neboli měnič iontů (Štulík 2004). Ionex je zobrazen na obrázku čtyři. Jedná se o vysokomolekulární látku s vysokou pórovitostí, jejíž základní skelet na povrchu nese náboj. Během separace dochází ke dvěma typům iontové výměny, a to aniontové, kdy stacionární fází je kladně nabitá anoda (anex) a ke kationové, kdy stacionární

fázi představuje negativně nabitá katoda (katex) (Cheriyedath 2016). Analyt, obsahující nabitě molekuly, prochází v kapalně formě chromatografickou kolonou (stacionární fáze), ve které je umístěna mobilní fáze. Na základě náboje jsou molekuly separovány a následně vymývány pomocí rozdílných iontových sil (Štulík 2004; Cheriyedath 2016).



Obrázek 4: Ionex

Zdroj: <https://docplayer.cz/2058765-Chromatografie-kralovna-analyz.html>

Hlavní analytická kolona hraje v celém systému velmi důležitou roli. Měla by být kompatibilní s rozpouštědly, což umožní řízenou selektivitu výměny aniontů a snadné vyčištění sloupců po analýze komplexních matic. Lze použít i tzv. předkolonu, která chrání hlavní kolonu před látkami s velmi silnou retencí. Předkolona v systému může být použita, ale nemusí (Giddings & Cazes 2002). Pro identifikaci organických i anorganických látek v ovocných šťávách, vínech, v potravinách, chemických přísadách, roztocích nebo odpadních vodách využíváme např. kolony AS10, AS11, AS11-HC, AS15, AS16, AS18, AS20, AS24 aj. navržené firmou Dionex, která je součástí koncernu Thermo Scientific, pomáhající urychlovat výzkum a zvyšovat kvalitu práce v laboratořích. Kolony mají jedinečnou strukturu složenou z vysoce zasítovaného jádra s aniontovou vrstvou na povrchu. Tato aniontově výměnná vrstva má regulovanou tloušťku, což přináší vynikající výsledky během separace organických a anorganických látek ve zkoumaném roztoku. Výměna aniontové vrstvy je funkcionalizována s kvartérním amoniem skupiny dané látky (Liang & Lucy 2010; Thermo

Fisher Scientific 2012). Kolon pro iontově výměnnou chromatografii je velké množství. Existují např. speciálně navržené kolony Aclaim Organic Acid, které díky zabudované polární funkční skupině umožňují separaci hydrofilních a aromatických organických kyselin ze vzorku. Tyto kolony fungují při nízkém pH vzorku s UV detekcí. Dále využíváme hydroxid-selektivní aniont-výměnné kolony, které jsou vhodné pro systémy s generátorem elektrolytických eluentů; karbonové kolony zajišťující kvalitu a nezávadnost pitné vody nebo kolony stanovující množství kovů ve vzorku, stanovující množství alkalických zemin z půdy nebo rozlišující amoniak a aminy ve vzorku (Pragolab 2018). Kromě Thermo Scientific patří mezi další výrobce kolon např. firma Hamilton nebo Watrex (Watrex 2017).

Prvním krokem při použití chromatografie je kalibrace stacionární fáze. Hodnoty pH spolu s iontovými silami výchozího pufru jsou nastaveny tak, aby bylo co nejvíce eliminováno navázání nečistot na stacionární fázi a aby došlo k uchycení žádaných složek na ionex (Schalley 2003). Po dosažení kalibrace následuje aplikace vzorku ve zředěných nebo koncentrovaných roztocích. Zajímá nás doba, kterou jsou dané ionty schopny setrvat na koloně. Malé molekuly s malým nábojem se vymývají z kolony jako první. Čím vyšší bude mít molekula náboj nebo velikost, tím bude v koloně pevněji a déle vázána (Schalley 2003; GE Healthcare 2016). Velkou roli hraje pH pufru, koncentrace solí – protiontů a teplota (Niessen & Tinke 1995).

Na závěr se kolona promývá puftrem s vysokou iontovou silou, čímž jsou odstraněny všechny zbylé navázané molekuly. Celý pokus je vyhodnocen počítačem, který sestaví graf s příslušnými píky neboli elučními křivkami (Schalley 2003; GE Healthcare 2016).

Vzhledem k tomu, že iontová i iontově výměnná chromatografie patří mezi kapalinové chromatografie a v názvu se skoro neodlišují, jsou tyto dvě metody často chybně spojovány v jednu. Rozdíl mezi těmito dvěma metodami je založen na principu včasné detekce vodivosti, neboli odstranění pufru z mobilní fáze ještě před detekcí. V roce 1970 Hamish Small a jeho kolegové separovali pomocí iontové chromatografie ionty z látky, která neobsahovala chromoforní částice a kde mobilní část tvořila nevodivostní látka – destilovaná voda. O dva roky později slavil Moore a Stein velký úspěch, kdy díky iontově výměnné chromatografii dokázali od sebe separovat amino kyseliny a transuranové prvky. Za tento objev získali Nobelovu cenu za chemii. Koncepce odstraňování pufru byla klíčovým prvkem pro odlišení iontové a iontově výměnné chromatografie. Tyto výzkumy podněcovaly vývoj

mnoha dalších metod, zabývajících se oddělováním iontových sloučenin v různých matricích (Major 2013).



Obrázek 5: Kapilární iontový chromatograf ICS - 4000

Zdroj: Pragolab 2018

3.1.5 Stanovení organických kyselin ve víně pomocí IC

Obecně se používá iontově výměnná chromatografie pro analýzu prvkových a nízkomolekulárních iontů (sloučenina o velmi malé molekulární hmotnosti), které se vyskytují v nabitěm stavu ve vodě. Po důkladné analýze je lze identifikovat i kvantitativně stanovit. Rozdělujeme anorganické ionty, ionty organických kyselin, aminy atd. Anorganické ionty odvozené od silné kyseliny nebo silné báze existují ve vodě ve formě kationtů nebo aniontů. Příprava vzorku vyžaduje pouze filtraci a ředění (Hayenga 2018).

Pro dosažení vhodné eluční síly se jako mobilní fáze pro iontově výměnnou chromatografii používá kombinace kyselin a zásad. Dosažení stabilní analýzy s téměř úplnou disociací lze docílit, pokud vzorky pronikají do chromatogramu s hodnotou pH v rozmezí od 3 do 11. Hodnota pH rozpouštědla je celkově důležitá pro celou iontově výměnnou chromatografii. Pro analýzu organických kyselin lze využít kyselou mobilní fáze, což vede k disociaci slabých kyselin nebo pufrovací metody, kdy se přidává pH pufr při výstupu

eluentu z kolony, což vede k navození neutrálního pH, které podporuje vyšší disociaci organických kyselin. Během této metody používáme elektrovodivostní detektor (Shimadzu 2019). V případě mojí analýzy používám zásaditou mobilní fázi – hydroxid sodný.

Vodivostní (konduktometrický) detektor monitoruje kontinuální vodivost mobilní fáze mezi dvěma elektrodami. Pro analýzu vína se také využívají citlivé UV detektory. UV detektory však nelze snadno použít pro identifikaci anorganických iontů. Vodivostní detektor je flexibilní a poskytuje přiměřeně nízké detekční limity spolu s užitečným rozmezím jak anorganických, tak i organických iontů (Prusisz et al. 2008). Pro vypracování této diplomové práce jsem použila konduktometrický detektor.

Získané hodnoty vzorku porovnávám s údaji ze známého standardu, výsledky lze následně identifikovat a kvantifikovat (Thermo Scientific 2012).

Podle množství, druhu nebo délky vazby kyselin, rozlišujeme organoleptické vlastnosti daného vína. Vinaři tedy musí analytickými metodami sledovat koncentrace různých organických kyselin, aby zajistili kvalitu svých vín, a následně případně upravovat pH, cukernatost nebo obsah alkoholu (Kordiš-Krapež et al. 2001). Pomocí chromatografie byly jako první kyseliny stanoveny vinná a jablečná. Tyto kyseliny řadíme mezi hlavní a vyskytují se ve víně ve vysokých koncentracích. Nejsou však jedinými identifikovatelnými organickými kyselinami. Ve víně můžeme detekovat i kyseliny, které se zde vyskytují v mnohem nižších koncentracích, jako je např. kyselina quinátová nebo askorbová, viz tabulka jedna. Iontově výměnnou chromatografií lze odhalit i kyseliny, jejichž výskyt ve víně značí nebezpečí. Do této skupiny řadíme např. kyselinu glukonovou, glukuronovou nebo slizovou, viz tabulka dvě (Kotani et al. 2004).

3.2. Vinná réva

Existuje jen málo zemědělských plodin, jejichž produkt je tak rozmanitý jako produkty révy vinné (*Vitis vinifera L.*), zobrazen na obrázku šest. Různorodost vína se navíc odráží v řadě měřítek od globálních (odlišné kontinenty) až po místní rozdíly mezi sousedními vinicemi. Víno pocházející od jednoho vinaře může být nazýváno Grand Cru (vysoká kvalita), zatímco jeho sousedovi zůstává jednoduché označení Communale (standart). Pestré profily vína nesouvisí pouze s geologií a klimatem, jsou především známkou dlouhodobé práce nespočetných generací pěstitelů a vinařů (Unwin 1996).

Právě historická interakce mezi člověkem a životním prostředím vytváří určitou kulturní identitu, která je základem porozumění a šíření enologie spolu s výrobou vína. Produkce tohoto nápoje hrála v historii v různých částech světa základní ekonomické, sociální, politické a ideologické role. Kulturní krajina vinogradů může být tedy považována za výraz transformací a interakcí určitého člověka na určitém místě (DonauMedia 2008).



Obrázek 6: Révá vinná

Zdroj: <http://botanika.wendys.cz/index.php/19-fr-polivka-uzitkove-a-pametihodne-rostliny-cizich-zemi/894-reva-vinna-vitis-vinifera>

Rékové hrozny mají obecně nejrozsáhlejší využití při výrobě vína. Jejich pěstování je rozšířeno všude po světě. Různá lokalita, půda, odlišné podnebí, lidský faktor a celkový vliv klimatických podmínek na vinné hrozny spolu s celou rostlinou, to je to čemu říkáme terroir. Terroir udává určitou specifikaci, která pak vytváří daný profil vína (DonauMedia 2008).

3.2.1 Rozdělení vín

Stolní vína obsahují méně než 14 % alkoholu, jsou označována jako lehká, naturální nebo vína vhodná k večeři. Obsahují malý nebo žádný nekvašený cukr, a proto se říká, že jsou suchá. Nicméně není nijak neobvyklé, že některá z nich mají zbytky přírodního hroznového

cukru. Šampaňské je také stolní víno. U většiny stolních vín je kyselost v rozmezí 5,5 – 8,5 mg/ l žádoucí (Jackson 2008).

Dezertní vína obsahují více než 14 % alkoholu, obvykle 17 až 20 %. Některá z nich, např. Sherry, se také nazývají aperitivem neboli vínem vhodným k předkrmu. Některá z nich mohou být docela suchá, většinou však obsahují střední až značné množství nekvašených hroznových cukrů. Na požadovanou úroveň cukru se přidávají hroznové lihoviny, které zastaví fermentaci. Tato vína jsou vyráběna z hroznů s vysokým obsahem cukru a s nízkým obsahem kyseliny (Winkler et al. 1974).

Rozsah pH mezi 3,1–3,4 je typický pro většinu bílých vína a rozsah pH mezi 3,3–3,6 pro většinu červených vín (Jackson 2008).

Odrůdy v ČR, které byly zapsány do Státní odrůdové knihy před více než 40 lety, jsou považovány za tradiční odrůdy vinné révy. Do této skupiny patří např.: Acoion, Aurelius, Cabernet Cortis, Cabernet Sauvignon, Frankovka, Irsai Oliver, Medea, Modrý Portugal, Mery, Müller Thurgau, Muškát Ottonel, Rulandské bílé, Rulandské modré, Rulandské šedé, Ryzlink rýnský, Ryzlink vlašský, Sauvignon, Svatovavřínecké, Sylvánské zelené, Tramín červený, Tristar, Veltlínské červené rané, Veltlínské zelené nebo Zweigeltrebe (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský 2017).

3.2.2 Popis vinné révy

Réva vinná má dřevnatou liánu s úponky, kterými se zachycuje přilehlých opor. Rostliny rostoucí volně v přírodě mohou dosahovat až 30 m, odrůdy pěstované na vinici dosahují obvykle výšky 0,5–3 m s průměrnou tloušťkou kmene do 50 cm (Skelton 2007). Borka kmene má světlehnědé zbarvení a loupe se v dlouhých pruzích, zbarvení letorostů je sytější až červenohnědé (Slavík 2010). Listy jsou hluboce dlanitě laločnaté se třemi až pěti laloky, v zásadě okrouhlé. Květy mají jednoduché hroznovité květenství nazývané lata, kulturní odrůdy jsou jednodomé, divoké odrůdy jsou dvoudomé. Plod tvoří šťavnaté bobule kulovitěho tvaru o velikosti 10–15 mm, zbarvení je nám známo od zelenožluté až po modrofialovou (Janča 1996). Mohutný kořenový systém, sahající hluboko pod povrch půdy, vypouští i vedlejší odnože na povrch (Skelton 2007). Denní teploty, optimální pro pěstování vinné révy, by se měly pohybovat mezi 18–25 °C. Pro správné dozrávání hroznů jsou vhodné oblasti, kde je teplý a dlouhý podzim, s dostatkem slunečního záření během roku a bez jarních mrazíků (Kuttelvašer 2003).

Do čeledi *Vitacea* spadá několik rodů, avšak pouze *Vitis vinifera* L. je důležitý pro výrobu vína. Tento botanický rod zahrnuje dva pod-rody *Euvitis* (pravé hrozny) a *Muscadinia* (Skelton 2007). Výhonky druhu *Euvitis* mají kůru, která je podélně pruhovaná fibrózou; jádra jsou přerušena v uzlech membránou; vidlicovité úponky s převážně protáhlými květy; bobule, které jsou v době zralosti přilepeny na stonky; a semena hruškovitá s dlouhým nebo krátkým zobákem. Naproti tomu výhonky druhu *Muscadiia* mají těsnou, nerozkládající kůru s prominentními ččkami; uzly bez membrány; jednoduché úponky; bobule, které se oddělují jeden po druhém, jakmile zrají; a semena podlouhlé, bez zobáku (Kraus 2005).

3.2.3 Pěstování

Pro pěstování vinné révy není důležité mít obrovský vinohrad, lze ji vysadit i doma na zahradě. Důležitá je kvalita půdy s dostatečným množstvím živin a hloubkou důležitou pro růst kořenů, dostatečné množství závlahy, slunečního světla a vyšší nadmořská výška pozemku (Munitz et al. 2018).

Vitis vinifera, jak už bylo zmíněno, patří mezi rostliny liánovitého charakteru s velmi vysokou vodní vodivostí. Co se týče stresového faktoru, ovlivňující množství vody, které rostlina zadrží, byl problém zaznamenán pouze ve výhoncích, nikoliv ve stoncích. Způsob zavlažování můžeme rozdělit na konstantní (nízké, střední a vysoké zavlažování) nebo dynamické (brzké/pozdní sezónní nedostatek vody). Vysoká dostupnost vody v době sezóny (vysoké zavlažování a pozdní schodek) vede k intenzivnímu vegetativnímu růstu (většímu průměru kmene, šířce a ploše kruhu), širším průměrům stonku a zvýšené specifické vodivosti. Distribuce velkých částic xylémem byla pozměněna stresem při suchu, kdy vysoká dostupnost vody v časně sezóně způsobila posun částic směrem k širším frekvenčním třídám (Munitz et al. 2018).

Pro zvýšení obsahu chlorofylu v listech během počátečních fáze růstu, zvýšení vodivosti v pozdějších etapách růstu, pro zlepšení růstu hroznů a následnou kvalitu vína, se doporučuje aplikace prohexadion-Ca na listy v počátečních fázích růstu rostliny. Prohexadion-Ca zlepšuje také odolnost hroznů proti hnilobě *Botrytis* v prvním roce, v druhém roce je však už neúčinná (Thomidis et al. 2018).

Mnohé studie se také zabývají vztahem mezi divokými a kultivovanými révami pomocí sestavení jejich genetických profilů. Celkové snížení genetické rozmanitosti bylo pozorováno u divokých odrůd, což podporuje nutnost vyvinout nové strategie charakterizace a zachování

divoké odrůdy. Zatímco kultivované révy jsou téměř zcela závislé na lidských zemědělských postupech a reagují na určité environmentální stresy, jako jsou např. nedostatky vody nebo patogenní záchvaty, divoké formy se zdají, že stále úspěšně čelí změnám v jejich přirozených stanovištích. Výsledky výzkumů zdůrazňují velký potenciál divokých forem, které by mohly být řešením otázek ohledně klimatických změn a rostoucí poptávce po udržitelných vinařstvích (Marrano et al. 2018).

3.2.4 Virus a škůdci

Virus révy vinné (GFLV) je jedním z nejstarších virových chorob této rostliny a způsobuje její degeneraci. Virus byl nalezen ve všech vinařských oblastech po celém světě. V roce 2011–2012 bylo pro odrůdy Schioppettino v severovýchodní Itálii a v jihozápadním Slovinsku provedeno srovnání mezi pěstovanými GFLV a zdravými révami. Výzkum ukázal, že infekce zapříčiněná GFLV způsobuje pokles výtěžku kvůli snížení hmotnosti svazků a hmotnosti bobulí. Vedle výtěžku byla také ovlivněna složka bobulí; v detailu se koncentrace anthokyaninu v obou odrůdách zvýšila, avšak významně jen u Schioppettina. Gen F3H1 (flavonoid-3-hydroxylasa) byl identifikován jako nejsilněji regulovaný gen biosyntetické dráhy flavonoidů, který lze použít proti GFLV. Jeho důležitou úlohou je zvyšování koncentrace anthokyaninu ve vinných hroznech infikovaných GFLV (Rupnik-Cigoj et al. 2018).

Mezi škůdce vinné révy patří mšička révokaz, vlnovník révový, sviluška ovocná, obaleč mramorovaný nebo zobonoska révová a hálčivec révový. Škůdci poškozují rostlině kořeny, listy nebo napadají přímo plody (DonauMedia 2008).

3.3. Chemické složení hroznů

Chemické složení je ovlivněno především odrůdou, stupněm vyzrálosti a stanovištními podmínkami. Bobule i mošt obsahují velké množství chemických sloučenin, které tvoří základ kvality hroznu a následně vína. Nejvíce zastoupenou složku představuje voda, tvořící až 90 % hmotnosti úrody (Ailer 2016).

3.3.1 Cukry

Tuto skupinu tvoří polyhydroxyderiváty karbonylových sloučenin (aldehydů nebo ketonů) nacházejících se v bobulích révy vinné. Cukry se v bobulích tvoří přirozenou fotosyntetickou cestou. Mezi nejdůležitější z nich patří fruktóza s glukózou, kdy převažující

podíl ve zrajících hroznech má fruktóza. Během stárnutí hroznů se však mění i poměr sacharidů, který se v době zralosti přibližně vyrovnává. Na základě jejich poměru rozlišujeme vína sladká a suchá. Výskyt polysacharidů ve víně je z důvodu tvorby koloidních sloučenin nežádoucí (Pavloušek 2010). Avšak polysacharidy mohou působit také jako "ochranné koloidy", které napomáhají dosažení stability proteinu a tartrátu, čímž se snižuje spotřeba bentonitu a náklady na energii. Bentonit spolu s želatinou využíváme k oddělování čisté části vína od hrubé. Ze sensorického hlediska mají polysacharidy potenciál ovlivnit všechny aspekty pocitu v ústech, včetně vnímání ztuhlosti, viskozity a hořkosti. K tomu dochází prostřednictvím interakcí s fenolickými látkami a nejpravděpodobněji změnou molekulární souhry mezi vodou a etanolem, což nakonec ovlivňuje vzájemné působení mezi polysacharidy a chuťovými spolu s hmatovými receptory v ústech (Gawel et al. 2018).

Cukernatost hroznů je hlavním parametrem pro zařazení vín do jakostních skupin, od čehož se dále odvíjí obsah alkoholu a kvalita vína. Docukrování řepným cukrem nebo sirupem, za účelem dosažení vyššího množství alkoholu, je naprosto normální. Nesmíme si tento pojem plést s doslazováním, které vede k sladší chuti vína. Veškeré sacharidy ve víně můžeme určovat pomocí polarimetrické metody (Zhang et al. 2017). Celková koncentrace glukózy s fruktózou se ve zralé hroznové šťávě pohybuje mezi 150–250 g/l. Pro výrobu kvalitních vín je důležitý minimální obsah 200 g/l, aby se vytvořilo dostatečné množství alkoholu (Barbe et al. 2007).

Koncentrace cukru ve šťávě z hroznů, zkráceně cukernatost, se měří ve stupních normalizovaného moštoměru ($^{\circ}\text{NM}$) moštoměrem. Normalizovaný moštoměr udává počet kilogramů cukru ve 100 litrech moštu.

Rozdělení vín podle cukrů dle legislativy ČR, tj. Nařízení Komise (ES) č. 607/2009 o označování vín:

- Jakostní víno lze vyrábět pouze z hroznů, jejichž cukernatost dosáhla nejméně 17 $^{\circ}\text{NM}$.
- Stolní vína lze vyrábět pouze z hroznů, jejichž cukernatost dosáhla nejméně 15 $^{\circ}\text{NM}$.
- Přívlastková vína (nedoslazovaná):
 - Kabinetní víno s cukernatostí nejméně 19 $^{\circ}\text{NM}$.
 - Pozdní sběr s cukernatostí nejméně 21 $^{\circ}\text{NM}$.
 - Výběr z hroznů s cukernatostí nejméně 24 $^{\circ}\text{NM}$.

- Výběr z bobulí s cukernatostí nejméně 27 °NM.
- Výběr z cibéb je možno vyrábět pouze z vybraných bobulí napadených plísní šedou nebo z přezrálých bobulí, které dosáhly cukernatosti nejméně 32 °NM.
- Ledové víno je možno vyrábět pouze z hroznů, které byly sklizeny při teplotě -7 °C a nižší a v průběhu sklizně a zpracování zůstaly zmražené, získané víno musí vykazovat obsah cukru nejméně 27 °NM.
- Slámové víno je možno vyrábět pouze z hroznů, které byly před zpracováním uloženy na slámě nebo rákosu, případně byly zavěšeny ve větraném prostoru po dobu nejméně tří měsíců a získaný mošt vykazoval obsah cukru nejméně 27 °NM.
- Zemské víno s cukernatostí nejméně 14 °NM.

(Komise evropských společenství 2009)

3.3.2 Fenolické sloučeniny

Fenolické sloučeniny jsou zodpovědné za většinu rozdílů, především v barvě a chuti, mezi červenými a bílými víny. Tyto sloučeniny mají baktericidní, konzervační i antioxidační účinky a díky nim mluvíme o tzv. francouzském paradoxu. Francouzský paradox spojuje pití červeného vína se snižováním kardiovaskulárních onemocnění v důsledku vychytávání volných radikálů, ukládajících se v lidském těle hlavně stresem. Červená barviva (antokyany) dosahují různých odstínů (červená až fialová) v závislosti na pH vína a způsobu zpracování hroznů (Doonan et al. 2017).

Mezi polyfenoly vína řadíme mnoho sloučenin s rozdílnými chemickými strukturami, např. antokyany, flavonoidy, taniny, stilbeny, fenolické alkoholy, hydroxybenzoové kyseliny aj (Oliveira et al. 2011).

Třísloviny (taniny), se nacházejí ve slupce hroznů a v pecičce. Jejich vliv na organoleptické vlastnosti vína je velmi významný, proto je jejich analýza a kvantifikace důležitá. Extrakce fenolů z vína je prvním krokem, který se analýzy týká. Následují chromatografické metody a spektrofotometrické analýzy, které slouží k jejich identifikaci. Tyto metody se neustále vyvíjejí (Lorrain et al. 2013).

Obsah fenolických látek závisí na klimatických a půdních vlastnostech pěstitelské oblasti. Tyto sloučeniny obsahuje třápina, dužina, slupka bobulí i semena vinné révy. Fenolické

sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností přispívají k vnímání viskozity, intenzity a hořkosti v červených vínech, ale jejich účinky jsou silně závislé na obsahu pH a obsahu etanolu (Gawel et al. 2018).

3.3.3 Dusíkaté látky

Adaptabilita kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, a spolu s tím spojené fermentační procesy vína, závisí na jejich silné schopnosti konzumovat dusík. Každý kmen kvasinek má své specifické požadavky na dusík, proto je před jejich přidáním nutné znát jednotlivé potřeby těchto kmenů, aby se předešlo nestabilitě s mikrobiální akumulací ethylkarbamátu. Široká genetická různorodost kmenů *S. cerevisiae* je výsledkem kombinace jejich přirozené genetické rozmanitosti (nebo jiných než domestikovaných kvasinek) spolu s různými domestikačními postupy. Kvasinky zaujímají mnohá přírodní stanoviště, působí na ně selektivní tlak, způsobený stresovými podmínkami prostředí a lidská aktivita. V důsledku kombinace těchto faktorů řadíme kmeny *S. cerevisiae* do pěti odlišných linií. Členíme je podle geografického původu nebo podle zdrojů izolace (SACP). Některé z nich (linie vín a saké) jsou pouze výsledkem odlišných událostí při domestikaci (Brice et al. 2018).

Nedostatečné množství dusíku ve víně zpomaluje fermentační procesy kvasinek, což vede k negativním organoleptickým vlastnostem vína. Při nedostatečné fermentaci se problematika dusíku řeší jeho přidáním ve formě fosforečnanu amonného. Aplikace dusíku na půdu nebo listy révy vinné v podobě močoviny zvyšuje obsah aminokyselin ve víně, hlavně pak prolinu. Tyto účinky pozitivně ovlivňují celkovou úrodu a zavodňovací systém (Canoura et al. 2018).

3.3.4 Aromatické látky

Aroma vína je jedním z nejdůležitějších parametrů, které určují charakter spolu s kvalitou vína, a to závisí na odrůdě, zralosti hroznů, na postupech vinifikace, na kvasinkové aktivitě a stárnutí vína (Radeka et al. 2007).

Za chuť fermentovaných nápojů, mezi které kromě vína patří i pivo, saké nebo cidery, můžou primární fermentační metabolismy kvasinek, při kterých vznikají transformací volných částic moštu monoterpeny ovlivňující chuť nápoje (Cordente et al. 2012). Obecně dochází k produkci enzymů přeměňujících neutrální částice vína na chuťové látky. Kvašení vína by mělo

probíhat pozvolně, aby nedocházelo ke ztrátám těchto aromatických látek (Styger et al. 2011).

Do skupiny aromatických látek také patří: estery; alkoholy; aldehydy; terpeny, kam řadíme především linalol, geraniol a nerol; pyraziny, jejichž obsah klesá se zralostí hroznů; sloučeniny síry, z nichž nejvýznamnější jsou thiole; aj. Sloučeniny síry mohou způsobovat i nechtěné pachy (guma, mokřý pes, zkažená vejce atd.) (Stávek 2002).

Během růstu hroznu dochází v různých etapách vývoje k řadě dynamických změn ve výši hladin koncentrací těkavých sloučenin. Množství těkavých sloučenin následně ovlivňuje koncentraci látek produkovaných kvasinkami. Díky tomu je nutný monitoring těchto látek, na jehož základě bereme ohled na použití kvasinek (Gawel et al. 2018).

Každá odrůda vína nemá své specifické zastoupení těkavých sloučenin, ve skutečnosti se ve víně různých odrůd nachází stejné aromatické látky. Aromatická odlišnost vín z různých odrůd révy je způsobená nepřeberným množstvím kombinací a koncentrací těchto látek. Důležité jsou především zdravé hrozny. Pokud by primární buket vína nebyl dobrý, sekundární buket, který vzniká při kvašení, už kvalitu vína pozitivním směrem neovlivní (Stávek 2002).

3.3.5 Minerální látky

Ve většině případů se koncentrace minerálních látek v rostlině odráží podle charakteristiky příjmu podnožím, akumulací odrůdou a klimatickými vlivy na rychlost transpirace. Velmi důležitou roli hraje také okolní prostředí vinice. Je důležité si uvědomit, že minerální látky nijak neovlivňují výslednou chuť vína (Stávek 2002).

Réva vinná, která vykazuje zvýšené množství olova, bývá spojována s vinicemi v okolí dálnic. Vysoká koncentrace hliníku je někdy zaviněna přidáváním bentonitu. V teplejším klimatu detekujeme vyšší míru dusíku. Selen, rtuť a olovo jsou potenciálně toxické a mohou se ve víně objevovat během fermentace (Jackson 2008).

Mezi specifické parametry ovlivňující kumulaci minerálních látek v rostlině patří i pH půdy. Např. stroncium, zinek a mangan jsou přednostně hromaděny v kyselých půdách, na druhé straně měď s vápníkem v alkalických. Železo a hliník měly v rámci studie stejné hodnoty koncentrací v kyselých i zásaditých půdách. Půdní pH ovlivňuje iontovou formu, v níž se prvek vyskytuje (Bravo et al. 2017).

Oxidační reakce mohou být katalyzovány v nepřítomnosti molekulárního kyslíku mědí a v menším rozsahu železem. Příkladem je oxidace kyseliny askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou a její další štěpení až na kyselinu šťavelovou s kyselinou threonovou. Železo podporuje polymeraci fenolů s acetaldehydem, zatímco ionty manganu katalyzují syntézu acetaldehydu. Měď a železo mohou tedy indukovat kovové chutě vína, avšak k tomu dochází pouze při velmi vysokých koncentracích. Fyziologické a metabolické procesy spojené s růstem a produkcí vinné révy silně ovlivňuje draslík. (Benítez et al. 2002).

Zareei et al. (2018) uvádějí, že listový postřik síranem draselným pozitivně působí na biosyntézu fenolických sloučenin spolu s antioxidační schopností enzymů, což zlepšuje nutriční a kvalitativní vlastnosti hroznů. Na druhou stranu hnojící postřiky s obsahem mědi mají na rostlinu kontaminační vliv.

3.3.6 Organické kyseliny ve víně

Organické karboxylové kyseliny mají ve víně sensorický i technologický význam. Přispívají ke složení, stabilitě a organoleptickým vlastnostem. Kyseliny působí také jako konzervační činidlo, což napomáhá obraně proti patogenním mikroorganismům. Čím je nižší pH, tím je obsah kyselin vyšší. Hodnota pH moštu před kvašením by měla mít hodnotu 3,1, což zabraňuje rozvoji nežádoucích mikrobům. Celková kyselost vín ve finále kolísá mezi pH 3,1–3,5 (Ailer 2016).

Většina organických kyselin v moštu a ve víně má jedno nebo více chirálních center. Tyto kyseliny jsou kromě toho i nezbytnou součástí citrátového cyklu (Davídek 1991). Kyseliny ve víně patří mezi slabé až středně silné. Zpravidla hovoříme o jednosytných nebo vícesytných alifatických, výjimečně aromatických, kyselinách, které můžeme rozdělit na titrovatelné a těkavé. Do skupiny titrovatelných kyselin řadíme kyselinu vinnou nebo jablečnou, ale i některé anorganické kyseliny jako je kyselina fosforečná (Romero & Munoz 1993).

Titrovatelné kyseliny jsou jedním z hlavních kvalitativně měřitelných parametrů v hroznech, které udává zastoupení jednotlivých skupin organických kyselin. Ideální obsah titrovatelných kyselin by se měl pro vína pohybovat v rozsahu 5,5–8,5 g/l (Fic 2015). Titrovatelnými kyselinami se označuje souhrn volně těkavých a netěkavých kyselin ve víně i solích, které je možno neutralizovat titrací NaOH nebo KOH. Počet ml spotřebovaného hydroxidu přímo odpovídá počtu g/l veškerých kyselin ve víně (Balík 1998). Těkavé kyseliny

v malém množství pozitivně ovlivňují chuť i aroma vína, avšak ve vyšším množství působí nepříznivě (Fic 2015).

Limity pro obsah těkavých kyselin, upraveno dle (International Organisation of Vine and Wine 2019).

Kyselina mravenčí, máselná a propionová.

Hranice je stanovena na:

- 1,1 g/l pro částečně zkvašený hroznový mošt, bílé nebo růžové víno
- 1,2 g/l pro červené víno

Výjimky pro některá česká vína (zatím v jednání s Komisí EU):

- 1,8 g/l (30 meq/l) pro výběr z bobulí, ledové víno
- 2,1 g/l (35 meq/l) pro výběr z cibéb, slámové víno

Vinná a jablečná kyselina tvoří 70–90 % ze všech organických kyselin, jež se nacházejí v bobulích vinné révy. Mezi důležité těkavé kyseliny patří octová kyselina. Mimo ní jsou ve vínu i kyselina mravenčí, máselná a propionová (Romero & Munoz 1993).

Původ organických kyselin ve víně je různý. Mezi nejdůležitější patří biosyntéza z révy vinné, metabolické cesty související s kvašením cukru, jablečno-mléčné kvašení a oxidace etanolu (Ribéreau-Gayon 2006).

Obsah veškerých kyselin bývá někdy uváděn jako obsah kyseliny vinné. Jedná se o postup měření založený na vyrovnávání pH na hranici, kterou umíme detekovat. Tzn., bylo potřeba „tolik“ činidla, jako by tam bylo „tolik“ kyseliny vinné. Ve francouzské enologické literatuře je vyjadřován obsah veškerých kyselin přepočtem na kyselinu sírovou, což znamená, 1,5 g kyseliny vinné = 1 g kyseliny sírové (Kraus 2009). Tabulka číslo jedna zobrazuje koncentrace kyselin, které by mělo víno obsahovat.

Tabulka 1: Obsah kyselin ve víně

Triviální název	Obsah kyseliny ve víně	Obsah kyseliny v moštu
Kyselina vinná	2–5 g/l	3–7 g/l
Kyselina jablečná	0–5 g/l	3–12 g/l
Tyto dvě kyseliny se podle zákona ČR mohou přidávat v množství do 1,5 g/l a až do 2,5 g/l do vína a to v letech s nepříznivým vývojem počasí.		
Kyselina mléčná	0,5 g/l	
Kyselina octová	0,3–0,6 g/l	
Kyselina jantarová	0,5–1,5 g/l	
Kyselina šťavelová	0–30 mg/l	
Kyselina askorbová	1–10 mg/l	50 mg/l
Během vinifikace se může přidávat až do množství 100 mg/l kyseliny askorbové.		
Kyselina citronová	0,05–0,5 g/l	0,2–0,5 g/l
Kyselina glykolová	Výskyt ve stopovém množství	

Zdroj: Ribéreau-Gayon 2006

Mezi kyseliny, jejichž výskyt ve víně značí nebezpečí, patří glukonová, glukuronová, galakturonová a slizová. Podrobnější popis nebezpečí je uveden v tabulce číslo dva.

Tabulka 2: Obsah kyselin ve víně značící výskyt nebezpečí

Triviální název	Nebezpečí
Kyselina glukonová	Výskyt šedé plísně
Kyselina glukuronová	Hniloba hroznů
Kyselina galakturonová	Maximální přijatelná hodnota je 1 g/l
Kyselina slizová	Hniloba vína při množství 0,1–0,5 g/l, hniloba moštu při množství 2g/l.

Zdroj: Ribéreau-Gayon 2006

3.3.6.1 Kyselina vinná

Nejvíce zastoupená a zároveň nejsilnější kyselina (pH 3–3,5) vyskytující se v hroznech je kyselina vinná, která odpovídá za kyselou a ostrou chuť hroznů i vína (Pavloušek 2008). V hroznech je její obsah metabolicky i mikrobiálně stabilní, proto bývá přidávána během výroby do moštů a vína, pokud je koncentrace kyselin pod požadovanou hladinou. Množství kyseliny vinné v hroznech se snižuje až při teplotách okolo 30 °C. V závislosti na pH roztoku, může být kyselina vinná přítomna v aniontové formě, jako vinan nebo hydrogenvinan. V nestabilizovaných vínech tyto formy způsobují krystalické srážky hlavně s vápníkem a ionty draslíku (Ribéreau-Gayon 2006). Na konci vegetační fáze růstu hroznů je koncentrace kyseliny v nezralých hroznech až 15 g/l. Koncentrace se mění v různých částech rostliny po

celou dobu růstu (Pavloušek 2008). V nedostatečně zasířených vínech, jež jsou uchovávány v teplejším prostředí, mohou bakterie mléčného kvašení rozkládat kyselinu vinnou na kyselinu mléčnou a octovou, čímž dochází k nechtěnému zvrhnutí vína. V jiném ovoci se vyskytuje pouze v minimálním množství (Ribéreau-Gayon 2006).

3.3.6.2 Kyselina jablečná

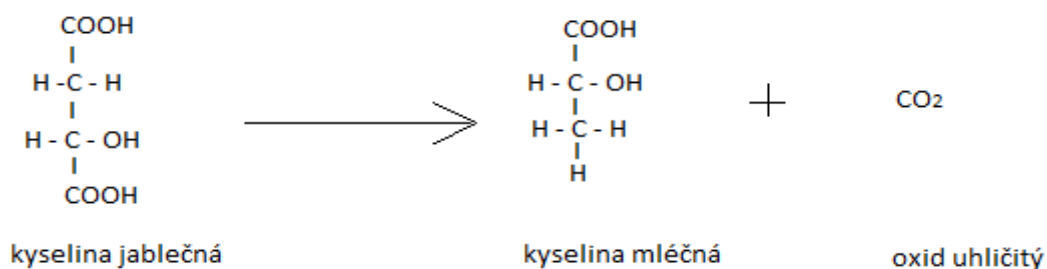
Druhé největší zastoupení, a tedy tvořící hlavní podíl kyselin spolu s kyselinou vinnou, má kyselina jablečná. Tato kyselina je kvasinkami, především rodu *Saccharomyces*, přeměňována během kvašení na alkohol nebo je biologicky odbourávána jablečno-mléčnou fermentací na kyselinu mléčnou. Vína vznikající takovouto cestou jsou pak stabilnější, plnější, kulatější a vykazují vyšší aromatickou komplexnost (Balmaseda et al. 2018).

Kyselina jablečná dodává hroznům a vínu tzv. zelenou chuť s ostrými, hrubými a nezralými tóny. Šťáva ze zelených hroznů, těsně před změnou barvy, může obsahovat koncentraci kyseliny ve výši až 25 g/l. Během dvou týdnů se objeví první známky změny barvy. Díky růstu se hrozny ředí a obsah kyseliny jablečné klesá o polovinu. Hrozny severovýchodních oblastí obsahují 4–6,5 g/l kyseliny jablečné, zatímco v jižních oblastech jsou koncentrace pouze 1–2 g/l (Ribéreau-Gayon 2006).

Její aniont se nazývá malát a je součástí citrátového cyklu, který je zobrazen na obrázku číslo osm. Pokud je využívána jako potravinové aditivum, označujeme jí E 296 (Vrbová 2008).

3.3.6.3 Kyselina mléčná

Během malolaktické fermentace (jablečno-mléčné kvašení) se přetváří drsná chuť kyseliny jablečné na chuť jemnější, způsobenou výskytem kyseliny mléčné. Tohoto efektu se snažíme docílit zvláště u mladých červených vín, z důvodu zjemnění jejich chutí. Kyselina mléčná je také na rozdíl od kyseliny jablečné velmi mikrobiologicky stabilní a má silnější konzervační účinky. Vína, u kterých proběhla jablečno-mléčná fermentace, jsou tedy stabilnější a odolnější vůči nežádoucím bakteriálním kontaminacím (Ailer 2016). Pokud se kyselina mléčná objeví jako hlavní složka vína, pochází obvykle její původ z metabolické činnosti patogenních bakterií, což vede k nežádoucím změnám vína. Koncentrace pohybující se okolo 0,5 g/l neznají ještě žádné nebezpečí (Fic 2015). Průběh malolaktické fermentace je znázorněn na obrázku sedm.

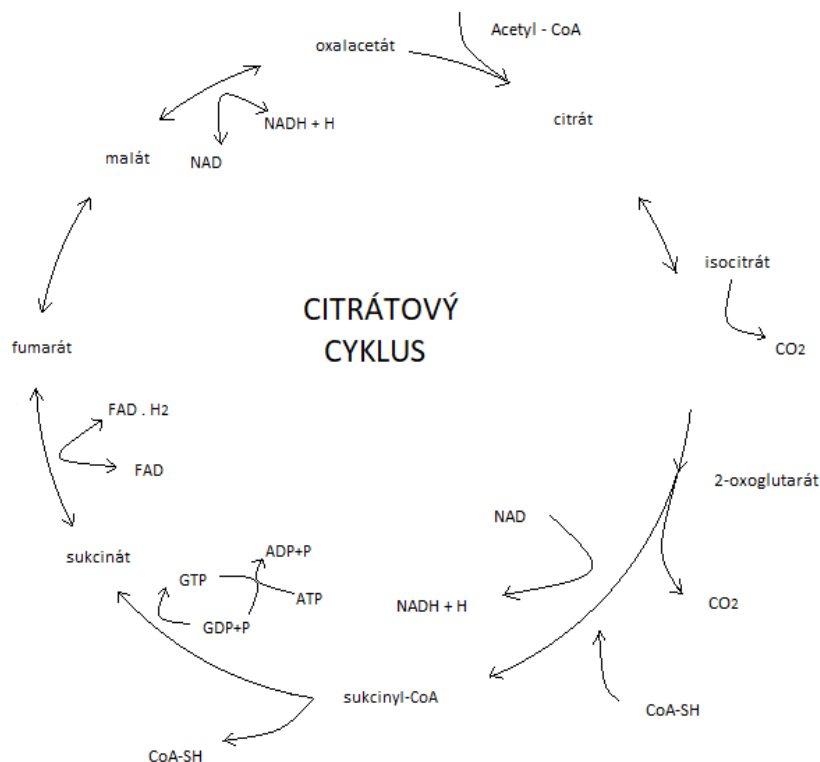


Obrázek 7: Přeměna kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou

Zdroj: Ailer 2016

3.3.6.4 Kyselina octová

Kyselina octová je ve vínech žádoucí pouze v minimálním množství, a to méně než 0,3 g/l. Při tomto množství může být ochucovadlem dodávající vínu příjemnou chuť a vůni, ale jakmile její koncentrace přesáhne hodnotu 0,8 g/l, lze očekávat výskyt nežádoucích octových či mléčných bakterií, které jsou spojovány s kontaminací vín a moštů (Jackson 2008). Estery octové kyseliny vedou také ke znehodnocení vína, neboť dodávají vínu octové pachy (Fic 2015). Spolu s koenzymem A tvoří octová kyselina aktivní formu označovanou jako acetylkoenzym A (acetyl-CoA), který je důležitou součástí citrátového cyklu. Citrátový cyklus je znázorněn na obrázku osm. Acetylkoenzym A se podílí i na metabolismu sacharidů a tuků (Murray et al. 2003).



Obrázek 8: Citrátový cyklus

Zdroj: Horák & Stazsková 2011

3.3.6.5 Kyselina jantarová

Kyselina jantarová je součástí velmi mladých vinných hroznů a je jedním z nejběžnějších vedlejších produktů metabolismu kvasinek. Vyhovují jí anaerobní podmínky. Hořce – slaná chuť kyseliny omezuje její použití pro okyselování vína, ale je považována za hlavní složku ovlivňující terroir vín (Jackson 2008). Díky těmto vlastnostem je používána pod označením E 363 jako látka zvýrazňující kyselost a slanost potravin (Vrbová 2008).

Kyselina jantarová je hlavní složkou vína, aktivující uvolňování žaludečních šťáv. V Krebsově cyklu se vyskytuje ve formě aniontu nazývaným sukcinát (Murray et al. 2003).

3.3.6.6 Kyselina šťavelová

Redoxní potenciál většiny mladých vín stabilizuje komplex mezi kyselinou šťavelovou a kovovými ionty jako je železo. Díky stárnutí vína redoxní potenciál stoupá a oxalát železnatý se stává nestabilní sloučeninou. Po disociaci může kyselina šťavelová vázat vápník a vytvářet krystaly šťavelan vápenatý. Přiměřené přidávání kyseliny šťavelové do vín zabraňuje nadměrnému hromadění vápníku ve víně (Amerine 1981).

Kyselina šťavelová je nejjednodušší dikarboxylovou kyselinou. V Krebsově cyklu je meziproduktem pro vznik oxalacetátu (Riemenschneider & Tanifuji 2011).

3.3.6.7 Kyselina askorbová

Kyselina askorbová, označována taky jako vitamín C, je organická sloučenina s antioxidačními účinky. Představuje významnou roli v redoxních systémech ve víně a v ovocných šťávách. V minulosti byla kyselina askorbová přidávána společně s oxidem siřičitým kvůli omezení fenolické oxidace, avšak její dlouhodobé používání je pochybné (Skouroumounis et al. 2008). Kyselina askorbová se také přidává do vín za účelem snižování atypického stárnutí chuti, které způsobuje nepříjemný zápach obvykle u vín, jež zažily období stresu během vegetačního období. (Jackson 2008).

3.3.6.8 Kyselina citrónová

Kyselina citrónová může mít až téměř agresivní, štiplavou chuť s máslovým nádechem. Díky tomu se ve víně vyskytuje pouze v malém množství s koncentrací okolo 0,05–0,5 g/l a v moštu zhruba 0,2–0,5 g/l (Ribéreau-Gayon 2006). Výjimku tvoří mošty napadené plísní nebo mošty vyrobené z hroznů sušených na slámě.

Kyselina citrónová je důležitým prekurzorem aromatických látek v hroznech, zpomaluje růst žádoucích i nežádoucích kvasinek a používá se pro odstraňování nadměrného množství železa s mědí ve víně (Jackson 2008).

V tabulce tři jsou uvedeny kyseliny s jejich systematickým, anglickým názvem, jejich sytost, sumární vzorec, hmotnost a CAS.

Tabulka 3: Kyseliny objevující se ve víně, upraveno dle CAS 2019.

Triviální název	Systematický název	Anglický název	Sytnost kyselin	Sumární vzorec	M (g/mol)	CAS
Kyselina vinná	2,3-dihydroxybutandiová kyselina	Tartaric acid	dvojsytná	C ₄ H ₆ O ₆	150	526-83-0
Kyselina jablečná	hydroxybutandiová kyselina	Malic acid	dvojsytná	C ₄ H ₆ O ₅	134	617-48-1
Kyselina mléčná	2-hydroxypropanová kyselina	Lactic acid	jednosytná	C ₃ H ₆ O ₃	90,1	50-21-5
Kyselina octová	ethanová kyselina	Acetic acid	jednosytná	C ₂ H ₄ O ₂	60,1	64-19-7
Kyselina jantarová	butandiová kyselina	Succinic acid	dvojsytná	C ₄ H ₆ O ₄	118	110-15-6
Kyselina šťavelová	ethandiová kyselina	Oxalic acid	dvojsytná	C ₂ H ₂ O ₄	90,0	144-62-7
Kyselina askorbová	2-oxo-L-threo-hexono-1,4,-lakton-2,3-endiol	Ascorbic acid	dvojsytná	C ₆ H ₈ O ₆	176	50-81-7
Kyselina citronová	3-karboxy-3-hydroxypentadiová kyselina	Citric acid	trojsytná	C ₆ H ₈ O ₇	192	77-92-9
Kyselina glykolová	2-hydroxyethanová kyselina	Glycolic acid	jednosytná	C ₂ H ₄ O ₃	76,1	79-14-1
Kyselina glukonová	2,3,4,5-tetrahydroxyhexanová kyselina	Gluconic acid	jednosytná	C ₆ H ₁₂ O ₇	196	526-95-4
Kyselina glukuronová	3,4,5,6-tetrahydroxytetrahydropyran-2-karboxylová kyselina	Glucuronic acid	dvojsytná	C ₆ H ₁₀ O ₇	194	6556-12-3
Kyselina galakturonová	2,3,4,5-tetrahydroxy-6-oxo-hexanová kyselina	Galacturonic acid	jednosytná	C ₆ H ₁₀ O ₇	194	685-73-4
Kyselina slizová	2,3,4,5-tetrahydroxy adipová kys.	Mucic acid	dvojsytná	C ₆ H ₁₀ O ₈	210	526-99-8
Kyselina mravenčí	methanová kyselina	Formic acid	jednosytná	CH ₂ O ₂	46,0	64-18-6
Kyselina máselná	butanová kyselina	Butyric acid	jednosytná	C ₄ H ₈ O ₂	88,1	107-92-6
Kyselina propionová	propanová kyselina	Propionic acid	jednosytná	C ₃ H ₆ O ₂	74,1	79-09-4
Kyselina pyrohroznová	2-oxopropanová kyselina	Pyruvic acid	jednosytná	C ₃ H ₄ O ₃	88,4	127-1-3
Vitriol	sírová kyselina	Sulfuric acid	dvojsytná	H ₂ SO ₄	98,1	7664-93-9
Kyselina solná	chlorovodíková kyselina	Hydrochloric acid	jednosytná	HCl	36,5	7647-01-0

3.4. Technologie výroby vína

Vinné hrozny se zpracovávají na víno ve vinařských provozech, speciálních halách nebo vinných sklepech, které většinou slouží pouze k ležení vína. Čeští vinaři vyrábějí nejčastěji vína bílá, červená, rosé, šumivá a některá speciální (ledová a slámová) vína. Minimální podíl výroby zastupují vína kořenitá a likérová. Česká červená vína se obvykle stáčí do lahví po 3–4 letech, bílé víno se obvykle lahvuje již po 8 měsících. Nejpěstovanější odrůdou v Čechách je Ryzlink rýnský (Pavloušek & Burešová 2015).

Bílá vína vznikají kvašením moštu, který získáváme ze zdravých hroznů. Rmut, což jsou bobule oddělené od třapiny a dalších pevných částí, necháváme odležet do dalšího dne, nebo ho přímo lisujeme. Po vylisování oddělujeme čistou část od hrubé, zaočkujeme kvasinkami a necháváme kvasit. Slupky jsou odstraňovány přímo při lisování. Z odtočeného kalu mohou vznikat vína sudová, která ale mají horší kvalitu. Vyváženost chuti, která je při výrobě vína hlavním faktorem, vychází primárně z dvou složek obsažených v bobuli hroznů. První z nich jsou kyseliny dodávající živost a svěžest vín a druhou složkou je alkohol, který dodává zakulacení spolu s olejovitou strukturou vína (Darrieussecqová & Dentrucková 2018).

U červených vín je důležitou složkou slupka hroznů, která obsahuje červená barviva. Barvivo ze slupek dostáváme teplem nebo alkoholem tzn., že víno kvasí i se slupkami. Při výrobě červených vín využíváme jablečno-mléčné fermentace, která dodává vínu sametové aroma, je ovšem důležité hlídat, aby pH nebylo vyšší než 3,1 (Kopeček & Kraus 2012).

Technologické postupy při výrobě vín se od sebe poněkud liší. Předmětem této diplomové práce je zkoumání převážně odrůd bílých vín, proto se ani tato kapitola nezabývá do hloubky technologickou výrobou červených vín, rosé vín, fortifikovaných vín ani žádnými zahraničními, jako je např. Madeira, Tokajské nebo Sherry.

3.4.1 Hrozen

Prvním a nejdůležitějším krokem při výrobě vína je výběr odrůdy podle regionu a požadované chuti. Mezi čerstvá až ovocná vína řadíme např. Sauvignon blanc nebo Riesling, mezi vína bohatá na chuť začleňujeme Chardonnay či Sémillon. Kvalitní a zejména rychlá sklizeň je základem výroby dobrého vína. Je velmi důležité, aby během sklizně ani během transportu nedošlo k negativnímu ovlivnění hroznů kvasinkami, plísněmi nebo bakteriemi (Pavloušek & Burešová 2015).

Velikost bobulí hraje pro výrobu vína velmi významnou roli, protože ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti výsledného nápoje. Hrozny se rozdělují na malé ($\leq 0,75$ g), střední (0,76–1,25 g) a velké ($> 1,25$ g). Střední plody jsou přítomny v nejvyšší frekvenci, což představuje více než 50 % populace bobulí. Relativní hmotnost pokožky a obsah rozpustných pevných látek, stejně jako celkové koncentrace fenolů a anthokyanu, klesají s velikostí bobulí, zatímco relativní hmotnost semen, pH a obsah kyseliny jablečné pozitivně korelují s hmotností bobulí. V souladu s tím ovlivňuje velikost bobulí také celkové složení vína, jelikož vína z malých bobulí vykazují nejvyšší hodnotu alkoholu a obsahu zbytkového cukru. Parametry výsledných vín ukazují, že malé plody jsou žádoucí pro výrobu vína s hlubší a nasycenou barvou. Pokud jde o těkavé sloučeniny, velikost bobulí vykazuje omezený účinek (Chen et al. 2018).

3.4.2 Odzrnění, lisování a síření hroznů

Velmi podstatnou součástí technologického zpracování vinných hroznů je odstraňování třapin (stopek), které by mohly vínu dodávat nepříjemnou pachutí. Tento proces by měl být uskutečněn co nejrychleji po sklizni. Třapiny lze dále využívat jako hnojivo vinic. Odzrněné bobule se nazývají rmut (Deiana et al. 2009).

Následuje mletí až drcení bobulí, jež má velmi pozitivní vliv na kvalitu vína. Typickým krokem při výrobě bílých vín je lisování rmutu při působení nízkého tlaku trvajícím od několika sekund až po několik hodin. I přes to, že lisování dodává vínu svěžest a typické aroma vína, je nutno počítat s tím, že také snižuje obsah fenolických látek přispívajících ke stabilitě vína (Pavloušek 2010).

V případě nahnilých hroznů, při sběru hroznů za vyšších teplot nebo u moštu delšího stání, se využívá síření, které zabraňuje rozvoji nežádoucích mikroorganismů. Rmut nebo celé hrozny se síří tak, aby obsah oxidu siřičitého (SO_2) v moštu nepřesáhnul 25 mg/l, při vyšším objemu by se nenastartovalo kvašení. Jako antioxidant se může místo síry používat také kyselina askorbová nebo různé taniny. SO_2 brzdí především divoké kmeny kvasinek, proto se síření provádí převážně na počátku kvašení (Balík & Stávek 2017). Oxid siřičitý je kategorizován jako alergen. Podle EU legislativy má výrobce povinnost označit jeho přítomnost při množství vyšším než 10 mg/l. Maximální přípustné množství SO_2 v bílých vínech je 200 mg/l, v červených 150 mg/l a v šumivých vínech jakostních 185 mg/l (Ailer 2016).

3.4.3 Macerace

U některých odrůd následuje macerace, která může být zařazována i před procesem lisování. Pod pojmem macerace rozumíme technologický proces, při kterém se uvolňují látky obsažené ve slupkách bobulí do moštu, tzv. vyluhování (Radeka et al. 2007).

U odrůd typu Pálava, Tramín červený nebo Muškát moravský je macerace využívána pro uvolnění širšího spektra aromatických látek. Např. u odrůdy Hibernál je zapotřebí vyluhování bobulí z důvodu pevné slizovité dužiny, která by se bez tohoto mezikroku velmi špatně lisovala (Pavloušečk & Burešová 2015).

Studie uvádějí různé postupy při maceraci hroznů. Základní macerace je při teplotě 20 °C po dobu 10, 20 a 30 hodin a kryomacerace při teplotě 7 °C po dobu 10, 20 a 30 hodin. Velmi záleží na koncentraci volných i vázaných monoterpenů a celkové koncentraci fenolů. Macerace zlepšující bohatost a chuťovou strukturu vína, navíc pomáhá eliminovat oxidaci (Radek et al. 2008).

3.4.4 Odkalení moštu

Čiření neboli odstraňování kalu je děj, při kterém dochází k poklesu částic suspenze ke dnu. Kal následně odstraníme, abychom co nejvíce eliminovali stupeň znečištění. Kal představuje odpad, jenž tvoří zbytky slupek, dužin atd. Alkohol vznikající při kvašení vína by z kalných částic mohl vyluhovat nežádoucí látky, čímž by došlo k znehodnocení vína (Kraus et al. 2008).

Během stáčení vína dochází k provzdušňování vína, které napomáhá vysrážení kalových částic. Opakované provzdušňování bylo dříve hojně využíváno. Dnes, při použití čiridel jako jsou kyselina křemičitá, bentonit, aktivní uhlí nebo želatina, stačí pouze stáčení provést jednou. Vína vyráběná spontánním kvašením se neodkalují (Kuttelvašer 2003).

3.4.5 Úprava obsahu kyselin

Jak už bylo zmíněno (viz kapitola 3.3.6), hodnota pH a množství titrovatelných kyselin hrají významnou roli při určování organoleptických vlastností vína. Jejich obsah se v průběhu zrání a zpracování vína mění, např. macerací zvyšujeme pH díky reakci kyselin s draslíkem. Víno lze okyselit přidáním kyseliny vinné v předepsaném množství. Pro umělou redukci kyselin používáme uhličitan vápenatý. Přidáním 0,666 gramů CaCO_3 do jednoho litru moštu

snížíme obsah kyseliny vinné o jeden gram. Tohoto výsledku také docílíme smícháním kyselého vína s vínem stejné odrůdy, ale méně kyselým. Existují i přípravky, které v podobě podvojných soli, vysráží kyselinu vinnou s kyselinou jablečnou stejným dílem (Bird 2010).

3.4.6 Úprava obsahu alkoholu

Většina silně kvasících kvasinek je tolerantní vůči alkoholu do cca 14 %, při vyšším obsahu obvykle dokváší kvasinky z rodu *Saccharomyces bayanus*, které jsou více rezistentní vůči alkoholu. Horní hranici ovšem představuje množství 16 % alkoholu. Při tomto množství kvasinky přestávají kvasit a umírají ve vlastním produktu, který je pro ně v tomto množství již toxický. Více procentních vín, z pohledu obsahu alkoholu, lze docílit výrobou fortifikovaných vín. Víno je v tomto případě dolihováváno líhem, višňovicí nebo grapou, na hodnoty pohybující se okolo 23 % alkoholu. Mošt tím přestává kvasit (Balík & Stávek 2017).

Nekonvenční kvasnice, zejména kvasinky, které nejsou *Saccharomyces*, vykazují potenciál produkovat vína s nižším obsahem alkoholu. Tyto druhy kvasinek, které jsou z velké části spojené s hroznom před sklizní, jsou přítomny v počátečních fázích fermentace, ale obecně nejsou schopné dokončit alkoholovou fermentaci. Bylo hodnoceno 50 různých izolátů jiných než *Saccharomyces*, které patří do 24 různých rodů, jejichž schopností je produkovat víno s nižší koncentrací etanolu, pokud se používá v sekvenčních inokulačních režimech s kmenem viru *S. cerevisiae*. Postupná inokulace (zaočkování) *Metschnikowia pulcherrima* AWRI1149, následovaná kmenem viru *S. cerevisiae*, byla nejlepší kombinací schopnou produkovat víno s nižší koncentrací etanolu než jednorázové inokulum. Sekvenční fermentace využívající AWRI1149, produkovala vína, která měla o 0,9 % (v/v) a 1,6 % (v/v) (odpovídající 7,1 g/l a 12,6 g/l) menší koncentraci etanolu v Chardonnay a Shiraz. Chardonnay, vytvořené postupným zaočkováním, mělo celkovou koncentraci esterů a vyšších alkoholů vyšší, zatímco celková koncentrace těkavých kyselin byla výrazně nižší. U postupně naočkovaných Shirazových vín byla vyšší celková koncentrace vyšších alkoholů a nižší celková koncentrace těkavých kyselin než u kontrolních vín *S. cerevisiae*. Celková koncentrace esterů se významně nelišila (Contreras et al. 2014).

3.4.7 Kvašení

Víno vzniká alkoholovým kvašením vinného moštu. K tomuto procesu dochází působením kvasinek, které rozkládají cukry za vzniku etanolu a oxidu uhličitého. Kvašení

probíhá vždy za anaerobních podmínek v kvasných nádobách buď spontánní, nebo řízenou fermentací. Optimální teplota pro kvasinky je 25 °C. Vína kvašená při nižších teplotách vykazují zpravidla ovocnější aromatikou (Balmaseda et al. 2018).

V průběhu spontánního kvašení dochází k rychlému rozvoji všech mikroorganismů nacházejících se ve vinném moštu, a ty mění spotřebou kyslíku aerobní prostředí na anaerobní. Mezi takovéto mikroorganismy řádíme např. *Kloeckera apiculata*, *Candida pulcherrima*, BMK aj. Výrobou vína spontánním kvašením může dojít k řadě technologických chyb, proto se hojně pro obchodní účely využívají kvasinky kulturní, jako jsou *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Saccharomyces oviformis* (Pavloušek 2010).

Počet mikroorganismů, které nejsou druhu *Saccharomyces* a jsou prospěšné při vinařství, se velmi zvyšuje. Mezi takové patří např. *Oenococcus oeni*, jejíž bezzávadná aplikace vyžaduje ještě důkladnější prozkoumání metabolismu (Balmaseda et al. 2018).

Zvláštní výjimku pak tvoří vína Tokajského typu, kdy jejich charakteristickou chuť spolu s aromatem způsobují hrozny napadené plísní *Botrytis cinerea* (Magyar & Bene 2006).

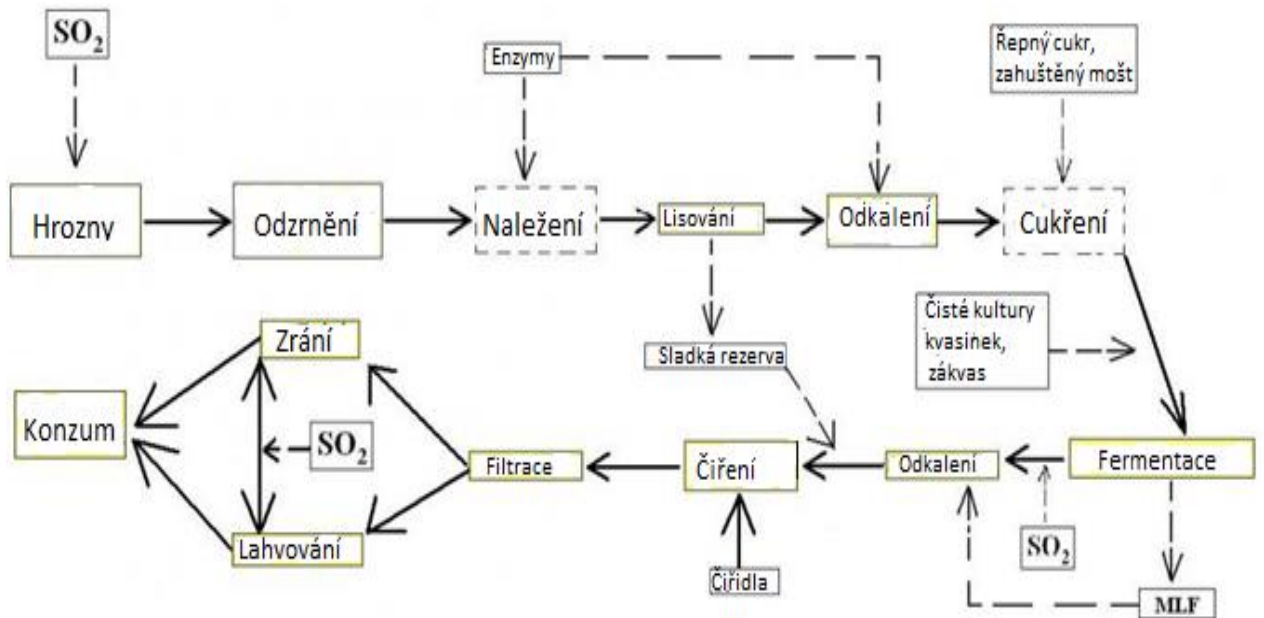
Čerstvý mošt je ošetřen oxidem siřičitým (max. 50 mg/l) a zaočkován čistou kulturou. Hlavní kvašení probíhá 2–3 týdny při teplotách 22–27 °C. Po dalších zhruba třech týdnech odumírá většina kvasinek důsledkem vysokého nárůstu alkoholu. Odumřelé kvasinky se hromadí na dně a víno se následně přepouští do vysířených sudů (Ribéreau-Gayon 2006).

3.4.8 Školení a zrání vína

Školení vína jsou všechny operace provedené odborně zdatným sklepmistrem. Hlavními kroky jsou čiření (odstranění bílkovinných a dalších nežádoucích látek), filtrace a příprava vína k plnění do láhví, případně speciální operace jako batonáž. Technologických operací při školení vín existuje nepřehledná řada, podle nichž se pozná tzv. rukopis sklepmistra. Na charakter vína má vliv také to, jestli je víno skladováno v nerezových nádobách, nebo v dřevěných sudech, u kterých je mnohem silnější proces tzv. mikrooxidace. Nové dřevěné sudy dodávají vínu další chuťové a aromatické látky (Darrieussecqová & Denturcková 2018).

Ideální podmínky pro zrání vína ve vinném sklepě jsou teploty mezi 9–12 °C a vzdušná vlhkost 70–80 %. Po prvním stočení vína může docházet k úpravě kyselosti, která v některých případech nastává samovolně, a to díky tvorbě vinného kamene. V průběhu výroby se může ve víně vytvořit 3–5 gramů vinného kamene na litr vína. Teploty pod bodem mrazu také

podporují tvorbu vinného kamene (Pavloušek 2010). Kompletní schéma výroby vína je zobrazeno na obrázku devět.



Obrázek 9: Schéma postupu výroby vína

Zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1190&typ=html

4. Metodika

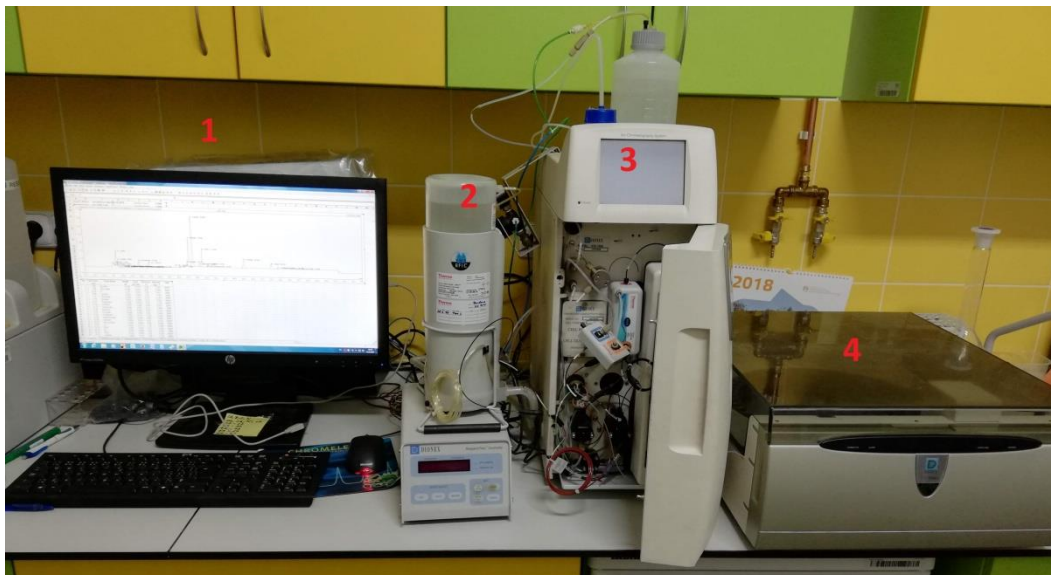
Identifikace aniontů organických kyselin a určení jejich hladin koncentrací v analyzovaných vínech byla možná díky použití iontově výměnného chromatografu Dionex ICS -1600 (Thermo Scientific Dionex™, USA) ve spojení s konduktometrickým detektorem. Separace iontů na základě velikosti a náboje molekul probíhala na předkoloně a analytické koloně IonPac AS11-HC (Thermo Scientific Dionex™, USA). AS11-HC má průměr mikroporézní pryskyřice asi 9 μm. Jako mobilní fáze byl použit od počátku do osmé minuty 1mM KOH izokraticky a poté s gradientem 0,55 mM/min (8–65 minuta). Údaje byly zpracovány a vyhodnoceny softwarem Chromeleon (6.80 Dionex). Pojmenování jednotlivých píků bylo nutné udělat manuálně. Byly porovnány vytvořené standardy organických kyselin spolu se zkoumanými vzorky. Data získaná z programu Chromeleon byla nakonec zpracována a přepočítána v MS Excelu. Chromatograf je zobrazen na obrázku deset.

4.1. Chromatograf

Cesta vzorku: dávkovač AS-DV (Dionex, USA) → dávkovací smyčka – součást vícecestného ventilu → pumpa – pumpující mobilní fázi do systému a proplachující mobilní fázi smyčkou → předkolona → kolona AS11-HC (Dionex, USA) → supresor ASRS 300–4 mm – tlumící vodivost mobilní fáze → CRD 200 (Dionex, USA) – zařízení odstraňující uhličitany z mobilní fáze vzorku → vodivostní cela – měřící konduktivitu vzorku.

Mobilní fáze je generována v generátoru mobilní fáze (zařízení, kde se nastavují časy měření, koncentrace mobilní fáze apod.) z koncentrátu KOH a deionizované vody (konduktivita < 0,055 μS/cm, a zároveň < 2 ng/l TOC, Crystal Adrona).

Teplota kolony v termostatu je vždy 30 °C, detektoru 35 °C a tlak v systému se pohybuje mezi 1800–2000 psi. Objem jednoho nástřiku, který projde z vialky vícecestným ventilem a dávkovací smyčkou do systému, činí zhruba 1,7 ml, objem 25 μl zůstává v dávkovací smyčce, která je propláchnuta do vlastní analytické části.



Obrázek 10: Chromatograf Dionex ICS-1600: (1) PC, (2) generátor, (3) vlastní ICS-1600, (4) dávkovač AS-DV

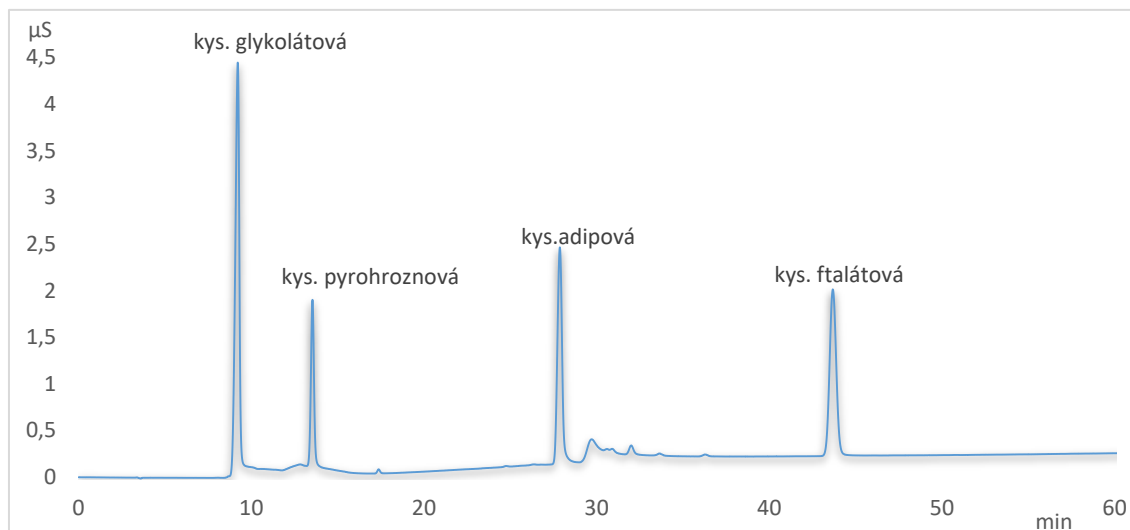
Zdroj: Vlastní fotografie

4.2. Standarty

Byly připraveny standarty aniontů kyselin uvedených v tabulce čtyři, tj. kyselina adipová, benzoová, isovalerová, valerová, α -ketoglutarová, isomáselná, pyrohroznová, glukonátová, glukuronová, galakturonová, slizová, quinátová, oxaloacetátová, glykolátová, cis-akonitová, trans-akonitová, isocitrónová, shikimátová a ftalová.

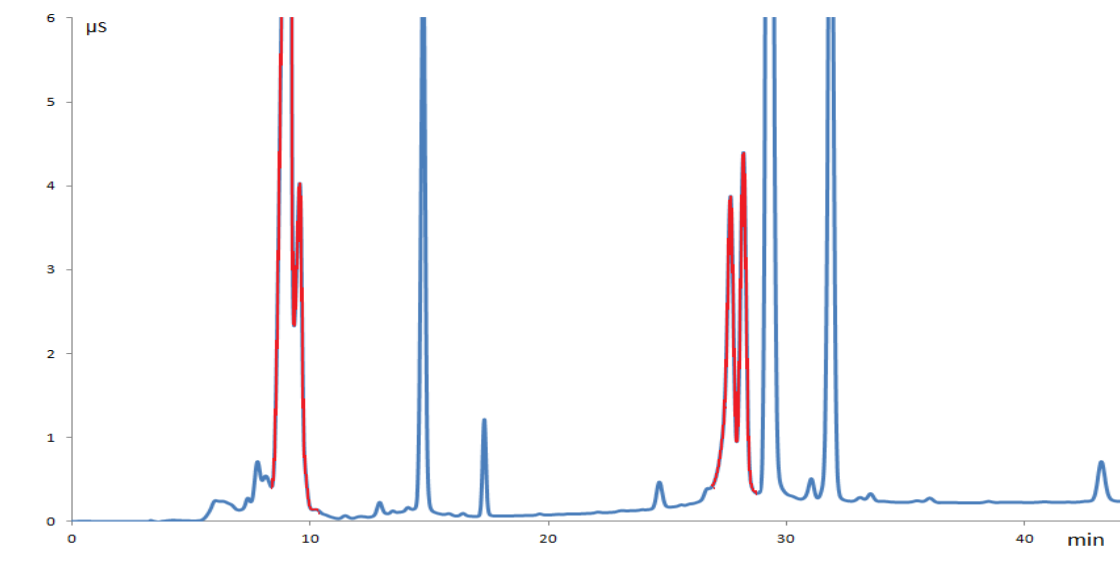
Bylo naváženo dané množství čisté látky, uvedené v tabulce čtyři jako skutečné množství m %, které bylo rozpuštěno ve 100 ml odměrné baňce pomocí destilované vody (konduktivita < 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$, a zároveň < 2 ng/l TOC, Crystal Adrona), tímto postupem vždy vznikl zásobní roztok o koncentraci 1 g/l.

Ze zásobních roztoků byl vždy napipetován 1 ml standardu do 100 ml odměrné baňky, která byla doplněna po rysku destilovanou vodou (konduktivita < 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$, a zároveň < 2 ng/l TOC, Crystal Adrona), čímž vznikl roztok o koncentraci 10 mg/l dané kyseliny. Ze vzniklého roztoku bylo odlito 5 ml do vialek speciálně navržených pro autosampler (dávkovač) AS-DV a vloženo do přístroje k analýze. Analýza každého vzorku trvala 65 minut, poté byl konečný chromatogram sestaven programem Chromeleon (6.80 Dionex). Jednotlivé píky bylo nutno manuální integrací zkontrolovat a pojmenovat. Na základě retenčního času kyselin, standardů a ověření pomocí standardního přídatku (spike), bylo možné pojmenovat jednotlivé píky. Chromatogram jedna zobrazuje pojmenované píky aniontů kyseliny glykolátové, pyrohroznové, adipové a ftalátové.



Chromatogram 1: Retenční časy kyseliny glykolátové,pyrohroznové, adipové a ftalátové – pík vytvoření software Chromeleon (6.80 Dionex)

Kromě jednotlivých kyselin byly pro kontrolu připraveny i jejich směsi. Složení směsí bylo vždy založené na kontrole správnosti měření a určování retenčních časů kyselin v případě, že docházelo ke koeluci (překryvům) píků. Koeluce píků u vína Dornfelder je znázorněna červeně na obrázku jedenáct. Obrázek pochází z vlastních analýz.



Obrázek 11: Koeluce aniotů shikimát/glykolát/acetát (9,254 min) a glutarát/muci/adipát (27, 514 min) naměřené u vína Dornfelder. Hodnoty zobrazených kyselin, viz kap. 5, graf 5.

Zdroj: Vlastní data

Tímto způsobem jsem určila kyseliny, které mají stejné retenční časy a které pomocí IC v tomto nastavení nelze odlišit.

První směs byla připravena z kyseliny glukonátové, glukuronové a galakturonové. Z odměrných baněk s množstvím 1 g/l bylo odpipetováno vždy po 0,5 ml do jedné společné odměrné baňky a doplněno po rysku destilovanou vodou (konduktivita < 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$, a zároveň < 2 ng/l TOC, Crystal Adrona). Vzniklá směs měla koncentraci jednotlivých aniontů 5 mg/l.

Stejným způsobem byla připravena i druhá směs, která byla složená z kyseliny isovalerové, valerové, quinátové, isomáselné, pyrohroznové, propionové, mléčné, mravenčí, octové, máselné, galakturonové, glukuronové a glukonátové.

Třetí směs tvořila kyselina glutarátová, jablečná, jantarová, slizová a adipová. Tato směs měla koncentraci 10 mg/l.

Tabulka 4 : Seznam použitých kyselin s jejich hodnotami

Výchozí kyselina	Mr (g/l)	C (g/l)	C (mol/l)	m 100 % (g)	m skutečné % (g)
Adipová	146	1,01	0,007	0,101	0,102
Benzoová	122	1,01	0,008	0,101	0,101
Isovalerová	102	1,01	0,010	0,101	0,102
Isomáselná	88,1	1,01	0,011	0,101	0,102
α-ketoglutarová	146	1,01	0,007	0,101	0,102
Valerová	102	1,01	0,010	0,101	0,102
Pyrohroznová	88,1	1,01	0,011	0,101	0,103
Glukonátová	218	1,12	0,005	0,112	0,112
Glukuronová	234	1,21	0,005	0,121	0,121
Galakturonová	212	1,10	0,005	0,110	0,113
Slizová	210	1,01	0,005	0,101	0,104
Quinátová	192	1,01	0,005	0,101	0,103
Oxaloacetátová	130	1,02	0,008	0,102	0,105
Glykolátová	76,1	1,01	0,013	0,101	0,102
Cis-akonitová	174	1,02	0,006	0,102	0,104
Trans-akonitová	174	1,02	0,006	0,102	0,104
Isocitrónová	258	1,36	0,005	0,137	0,146
Ftalová	166	1,01	0,006	0,101	0,102
Shikimová	174	1,01	0,006	0,101	0,102

Kyselina isovalerová, isomáselná, valerová a pyrohroznová byly v kapalném stavu.

4.3. Kalibrační řady

Na základě retenčních časů aniontů kyselin a anorganických aniontů, které jsou znázorněny v tabulce pět, byly vytvořeny čtyři kalibrační řady. Každá kalibrační řada, kromě první, byla připravena v pěti různých koncentracích, a to 0,1 mg/l, 1 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l a 40 mg/l. Po proměření byly sestaveny chromatogramy a jejich píky byly vyhodnoceny. Na základě plochy píků, spolu se známou koncentrací, sestavil softwarový program Chromeleon (6.80 Dionex) kalibrační křivky, díky kterým bylo možné identifikovat kyseliny přítomné ve víně. Pro kontrolu sloužily připravené standarty jednotlivých kyselin.

Některé kyseliny mají díky stejné velikosti náboje stejné retenční časy, dochází ke koeluci (překryv píků). Aplikací IC s kodymetrickým detektorem nelze tyto anionty odlišit. Jako koeluované kyseliny byly označeny kys. shikimátová/glykolátová/octová; kys. oxaloacetátová/pyrohroznová; kys. jantarová/jablečná; kys. vinná/malonová; kys. šťavelová/fumarová; kys. ftalátová/ PO_4^{3-} a kyselina adipová/slizová/glutarátová. V tabulce pět jsou tyto kyseliny zobrazeny zeleně.

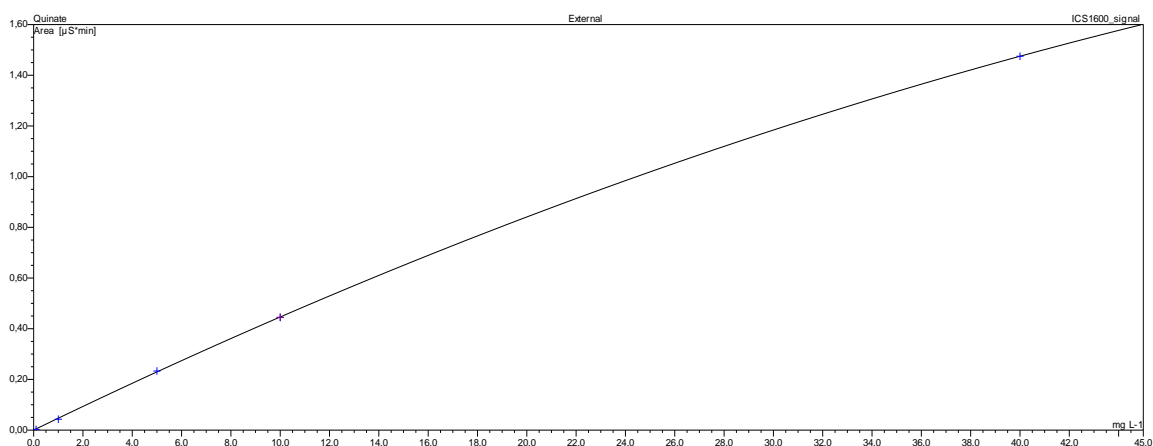
Tabulka 5: Anionty kyselin, anorganické anionty a jejich retenční časy

Aniont kyseliny	Aniont	Retenční čas (min)	Aniont kyseliny	Aniont	Retenční čas (min)
Quinátové	Quinát	7,59		NO_3^-	25,162
Glukonátové	Glukonát	8,218	Glutarátové	Glutarát	27,514
	F^-	8,575	Slizové	Mucic	27,514
Mléčné	Laktát	8,957	Adipové	Adipát	27,877
Shikimátové	Shikimát	9,254	Jantarové	Succinát	28,639
Glykolátové	Glykolát	9,254	Jablečné	Malát	28,639
Octová	Acetát	9,254	Vinné	Tartrát	29,797
Propionové	Propionát	11,009	Malonové	Malonát	29,797
Mravenčí	Formát	11,902	Maleátové	Maleát	31,412
Isomáselné	Isobutyryát	12,886		SO_4^-	32,316
Máselné	Butyryát	13,217	α -	α -	
			ketoglutarové	ketoglutarát	32,690
Oxalacetátové	Oxaloacetát	13,829	Šťavelové	Oxalát	34,748
Pyrohroznové	Pyruát	13,829	Fumarové	Fumarát	34,748
Isovalerové	Isovalerát	14,953	Ftalátové	Ftalát	43,962
Galakturonové	Galakturonát	15,061	PO_4^-	Fosforečnany	43,962
Valerové	Valerát	16,461	Citronové	Citrát	51,190
Glukuronátové	Glukuronát	16,795	Isocitrónové	Isocitrát	53,018
	Cl^-	17,500	Cis-akonitové	Cis-akonitát	55,154
	NO_2^-	19,316	Trans-akonitové	Trans-akonitát	59,376
	Br^-	24,321			

Při pojmenovávání aniotů je upřednostňováno používání anglických názvů (acetát, laktát aj.) před počestilými výrazy (octan, laktát aj.).

1. Kalibrační řada: F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{2-}

2. Kalibrační řada: kyselina quinátová, mléčná, octová, propionová, mravenčí, máselná, isovalerová, valerová, slizová, jablečná, vinná, maleinová, α -ketoglutarová, šťavelová, citrónová, cis-amonitová. Tabulka šest znázorňuje statické parametry kalibrace kyseliny quinátové. Na obrázku dvanáct je zobrazena kalibrační křivka kyseliny quinátové, parametry křivky jsou v tabulce šest.



Obrázek 12: Kvadratická kalibrační křivka kyseliny quinátové

Zdroj: Vytvořeno programem Chromeleon

Tabulka 6: Statické parametry kyseliny quinátové a 2. kalibrační řady

Kyselina	Koeficient determinace (%)	Směrnice přímky	Zakřivení
quinátová	99,9976	0,0472	- 0,0003

3. Kalibrační řada: kyselina glukonátová, shikimová, isomáselná, oxalátová, galakturonová, glukuronová, glutarátová, malonová, fumarová, isocitrónová, trans-akonitová

4. Kalibrační řada: kyselina glykolátová, pyrohroznová, adipová, ftalátová. Retenční časy této řady jsou v tabulce sedm, která popisuje koncentraci píků a číselně přibližuje retenční časy kyselin.

Tabulka 7: Anionty 4. kalibrační řady

Anionty kyselin	Retenční čas (min)	Koncentrace píku (mg/l)
Glykolát	9,22	9,92
Pyruát	13,55	10
Adipát	27,88	9,77
Ftalát	43,69	10

4.4. Výpočty

Údaje, získané z Chromeleonu (6.80 Dionex), byly následně propočítány a zpracovány v MS Excelu.

Zásobní roztok kyselin o koncentraci 1 g/l: Bylo naváženo skutečné množství kyseliny, vypočteno násobením molární hmotnosti s koncentrací a objemem 0,1 l dané kyseliny, rozpuštěno v deionizované vodě (konduktivita < 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$, a zároveň < 2 ng/l TOC, Crystal Adrona) ve 100 ml odměrné baňce.

Roztok kyseliny o koncentraci 10 mg/l: Byl připraven ze zásobního roztoku, odpipetováním 1 ml zásobního roztoku a následným doplněním po rysku tou samou deionizovanou vodou v odměrné baňce o objemu 100 ml.

Směsi kontrolních kyselin: Bylo napipetováno od každé požadované kyseliny 0,5 ml ze standardu o koncentraci 10 mg/l a doplněno do 50 ml odměrných baněk opět destilovanou vodou.

Kalibrační řady:

- Pro dosažení koncentrace 0,1 mg/l byl odebrán 1 ml kyseliny z připraveného roztoku o koncentraci 10 mg/l, napipetován do 100 ml odměrné baňky a doplněn po rysku deionizovanou vodou.
- Pro dosažení koncentrace 1 mg/l bylo odebráno 0,1 ml kyseliny z připraveného roztoku o koncentraci 1 g/l, napipetováno do 100 ml odměrné baňky a doplněno po rysku deionizovanou vodou.

- Pro dosažení koncentrace 5 mg/l bylo odebráno 0,5 ml kyseliny z připraveného roztoku o koncentraci 1 g/l, napipetováno do 100 ml odměrné baňky a doplněno po rysku deionizovanou vodou.
- Pro dosažení koncentrace 10 mg/l bylo odebráno 1 ml kyseliny z připraveného roztoku o koncentraci 1 g/l, napipetováno do 100 ml odměrné baňky a doplněno po rysku deionizovanou vodou.
- Pro dosažení koncentrace 40 mg/l byly odebrány 2 ml kyseliny z připraveného roztoku o koncentraci 1 g/l, napipetovány do 50 ml odměrné baňky a doplněny po rysku deionizovanou vodou.

Vzorky vín: Vzorky byly připraveny ve 100krát zředěné koncentraci. Do 100 ml odměrné baňky byl odměřen 1 ml zfiltrovaného vína (filtrace přes stříkačkový membránový systém 0,45 μm) a po rysku doplněn tou samou deionizovanou vodou jako roztoky předešlé. Výsledky bylo tedy nutné 100krát násobit, abychom získali skutečné hodnoty aniontů ve víně.

Metoda standardního přídávku (spike): Podstatným rysem této metody je nutnost provedení dvou nástřiků. Nástřik původního vzorku a nástřik vzorku s přidaným množstvím čisté stanovované složky. Nepřidáváme tedy novou složku, ale samotnou stanovovanou látku. Je nutné znát přesné množství přidané složky, přidaný standard se totiž neseparuje. Tuto metodu využíváme v případě, že si nejsme jistí, jestli se ve víně objevuje jedna nebo druhá kyselina tzn., že jejich retenční časy jsou velmi blízké (Volka 1995). Byl odměřen, do 50 ml odměrné baňky, 1 ml hledané kyseliny ze zásobního roztoku o koncentraci 1 g/l. Hledaná kyselina byla v odměrné baňce doplněna po rysku analyzovaným vínem, nikoliv deionizovanou vodou. Výsledná koncentrace spiku činila 20 mg/l.

4.5. Vzorky vín

Od každého vína byl odebrán vzorek, který byl 100krát naředěn, viz kap. 4.4. Ředění bylo zvoleno tak, aby bylo přístrojem možno změřit kyseliny v rozsahu kalibrační řady. Naměřené hodnoty byly přepočteny na skutečný obsah organických kyselin ve víně. Ředění vzorků je také důležité z pohledu ochrany přístroje (velikost částic vzorku vs. filtry). Připravené standardy byly přelity do 5 ml vialek, speciálně určených pro tuto analýzu, a vloženy do přístroje k vyhodnocení. Pomocí dávkovače AS-DV (Dionex, USA) byly vzorky nastříknuty na kolonu AS11-HC (Thermo Scientific Dionex TM, USA). Analýza každého vzorku trvala 65 minut,

kdy byl konečný chromatogram sestaven programem Chromeleon (6.80 Dionex). Jednotlivé píky bylo nutno manuální integrací zkontrolovat a pojmenovat. Výsledky bylo nutno porovnat s kalibračními řadami.

Pro tuto práci byly změřeny čtyři různé vzorky vín: Rulandské šedé (2017) ze Zapletalova vinařství ve Velkých Bílovicích; Ryzlink rýnský (2017) kategorie VOC z vinařství Znovín Znojmo; tetra-packové víno Rucio (2018) a červené víno Dornfelder (2015) z vinařství Lukáše Hlineckého. Dále bylo analyzováno šest vín na začátku jejich vinifikace. Tyto vzorky byly z odrůdy Chardonnay Stávkova vinařství, kdy každé víno zráló za odlišných vnějších a vnitřních podmínek. Použité kvasinky a místo kvašení je zaznamenáno v tabulce osm.

Na základě obsahu aniontů kyselin ve víně bylo možné určit, která kyselina a v jakém množství se ve víně objevuje.

4.5.1 Vinařství Stávek

Chardonnay je starobylá francouzská odrůda z Burgunska, pravděpodobně vzniklá křížením odrůd Heunisch x Rulandské modré (Kopeček & Kraus 2012).

Tabulka 8: Vzorky vín ze Stávkova vinařství

Název	Specifikace	Místo kvašení
BQ-FF		barikový sud Françoise Frères
Delta	kvasinky Delta	neruzový tank
Crion	kvasinky CRYO	neruzový tank
Qvevri	zrání na slupkách	hlíněná nádoba Qvevri
Sud		dubový sud 1500 l, nevypalovaný
BQ-D		barikový sud Demptos

4.5.2 Rulandské šedé (2017)

Rulandské šedé, zobrazené na obrázku třináct, je starobylá francouzská odrůda z oblasti Burgunska, odkud se přes oblast Champagne rozšířila do celé Francie a následně přes Maďarsko do celého světa. Z pohledu organoleptických vlastností se Rulandské šedé vyznačuje nažloutlou barvou spolu s pomerančovo-medovou příchutí. Jedná se o víno polosuché z pozdního sběru, chuť bývá označována jako plná s vyšším obsahem glycerolu a alkoholu. Barva bobulí je modrošedá až načervenalá. Rulandské šedé vzniklo mutací z odrůdy Rulandské modré (Pinot Noir). Legislativně je také povolený název Pinot grigio (Kopeček & Kraus 2012).



Obrázek 13: Rulandské šedé (2017), Zapletalovo vinařství

Zdroj: Vlastní fotografie

4.5.3 Ryzlink rýnský (2017)

Ryzlink rýnský se řadí mezi nejpěstovanější a nejkvalitnější odrůdy na našem území. Byl vyšlechtěn spojením odrůd Tramínu spolu s Gouais blanc (Heunisch) a je používána především na výrobu vysoce kvalitních vín. Jedná se o víno polosuché získané z bílých hroznů. Ryzlink rýnský má nazelenale žlutou barvu s chutí připomínající meruňky, broskve a jarní květy. Označujeme ho také jako víno králů. Víno je vhodné k archivaci (Znovín Znojmo 2018). Zkoumaný Ryzlink rýnský je zobrazen na obrázku čtrnáct. Mezi VOC vína z této oblasti řadíme Sauvignon, Ryzlink rýnský



Obrázek 14: Ryzlink rýnský (2017), Znovín Znojmo

Zdroj: Vlastní fotografie

Veltlínské zelené nebo jejich cuvée. Vína s tímto označením musí mít výraznější chuť a vykazovat typické sensorické vlastnosti terroir. Cukernatost hroznů, které musí být

sesbírány ručně, musí být nejméně 19 °NM, obsah alkoholu nesmí přesáhnout 13,9 % objemových

a bytkový cukr spolu s jablečno-mléčnou fermentací je povolen v souladu s nařízením Komise Evropské Unie č. 753/2002, čl. 16. Hektarový výnos vinic nesmí být vyšší než 7 tun (Nařízení Komise 2009).

4.5.4 Rucio (2018)

U španělského stolního vína prodáváného v tetra-packu, které je zobrazeno na obrázku patnáct, byl uveden ročník zpracování 2018. Víno má čirou, nažloutlou barvu s lehce ananasovou vůní, chuť je trpčí. Obsah alkoholu je 11 % objemových.

Naměřené koncentrace aniontů kyselin v tomto víně udává graf číslo pět.



Obrázek 15: Tetra-packové víno Rucio (2018)

Zdroj: Vlastní fotografie

4.5.5 Dornfelder (2015)

Vybrané víno mělo poněkud horší organoleptické vlastnosti, chuť s konzistencí byla lehce táhlovitá. Lahev červeného vína Dornfelder, která byla analyzována, je na obrázku šestnáct

Barva vína byla velmi tmavá a vůně připomínala brusinky s lesním ovocem, což je ovšem podle internetového serveru, pro tuto odrůdu normální (Vína z Moravy vína z Čech 2018).



Obrázek 16: Dornfelder (2015), Lukáš Hlinický

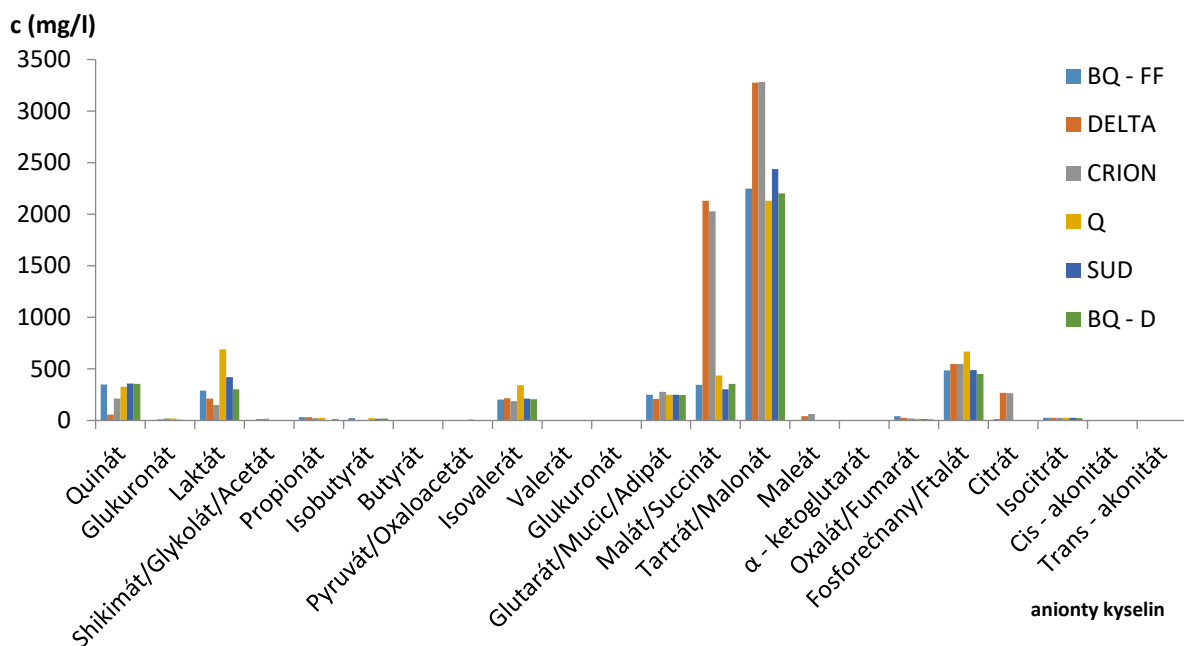
Zdroj: Vlastní fotografie

5. Výsledky

Výsledná data byla získána ze 100krát naředěných vín. Hodnoty koncentrací kyselin ve víně zaznamenané v následujících grafech a tabulkách jsou přepočteny pomocí MS Excel na skutečné hodnoty, obsažené ve vínech.

U vín ze Stávkova vinařství, které byly měřeny na začátku jejich vinifikace, byly viditelně rozdílné hodnoty naměřeny u citrátu, maleátu, malátu/succinátu a shikimátu/glykolátu/acetátu, a to u vzorků Delta a Crion, do kterých byly přidány čisté kultury kvasinek. Hodnoty těchto aniontů byly mnohem vyšší než u vzorků, které kvasily spontánně. Viditelně vyšší hodnoty laktátu, pyruátu/oxaloacetátu a fosforečnanů/ftalátů měl vzorek Qvevri zrající na slupkách v hliněných nádobách. Vzorek Crion měl oproti ostatním vzorkům mnohem nižší hodnotu quinátu. U oxalátů/fumarátu byl velký rozdíl mezi hodnotami naměřenými u vzorku BQ-D a BQ-FF. Oba tyto vzorky zrály v barikových sudech, ale každý byl vyrobený od jiné firmy.

U BQ-FF byla naměřena vyšší hodnota laktátu než u ostatních analyzovaných vín, kromě vína Dornfelder. Hodnoty malátu/succinátu byly naopak u všech vín nižší než u BQ-FF, opět kromě u vína Dornfelder. BQ-D měl v porovnání s ostatními víny nízké hodnoty citrátu a malátu/succinátu, quinát byl vysoký. Vzorky vín Delta a Crion měli tartát/malonát významně vyšší než ostatní vína. Hodnoty malátu/succinátu měl vyšší pouze Ryzlink. U vzorku Qvevri byla zaznamenána vyšší hodnota u laktátu a fosforečnanů/ftalátů oproti ostatním vínům. Naopak hodnoty citrátu měl úplně minimální. Vzorky zrající na slupkách v dubovém sudu měly nízké hodnoty citrátu, malátu/succinátu a isovalerátu v porovnání s ostatními víny. Naměřené hodnoty Stávkových vín jsou zaznamenány v tabulce devět a grafu jedna.

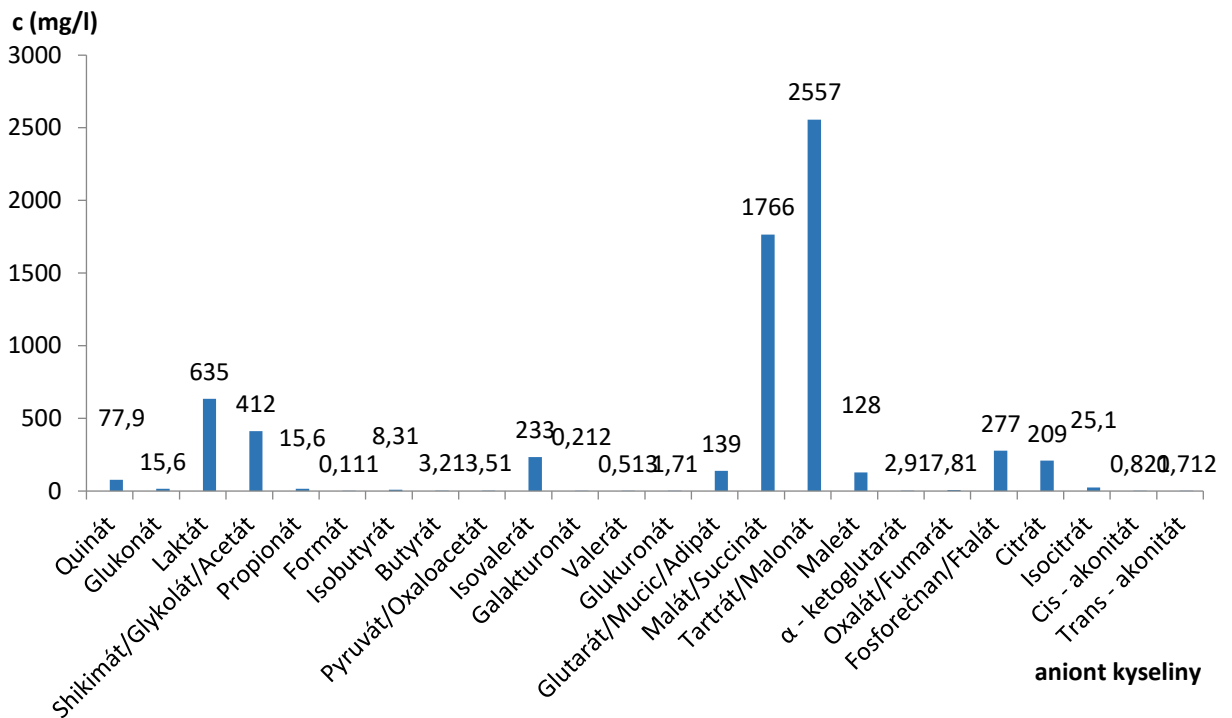


Graf 1: Koncentrace aniontů kyselin – Stávkovo vinařství, odrůda Chardonnay

Tabulka 9: Koncentrace aniontů kyselin – Stávkovo vinařství, odrůda Chardonnay

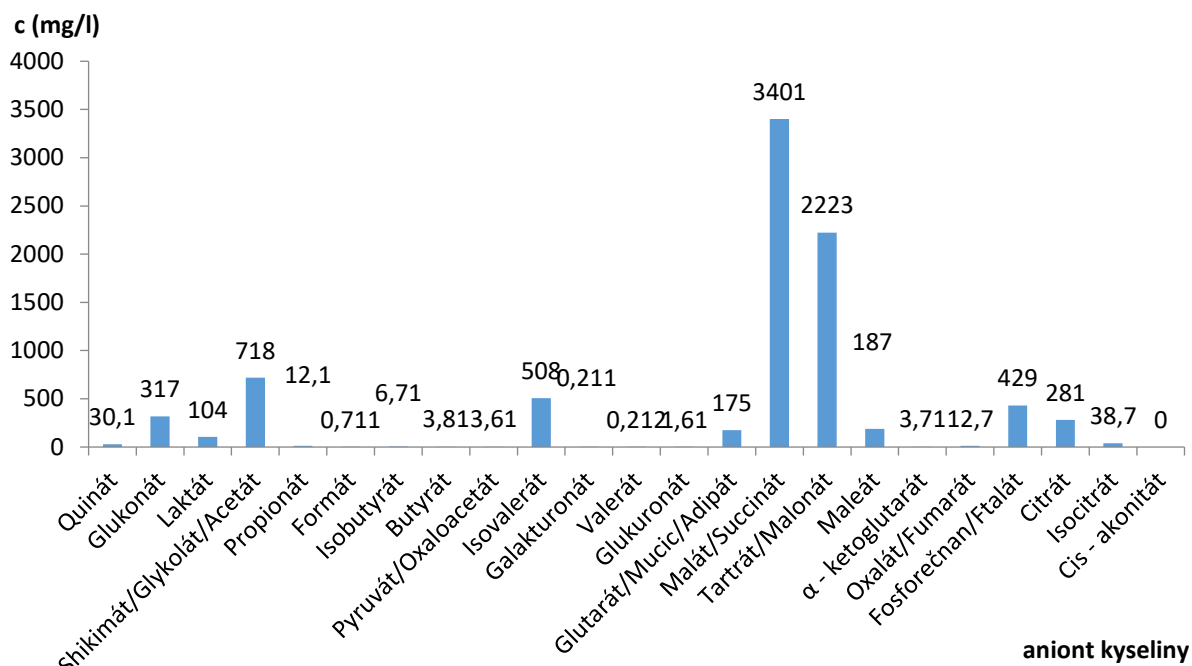
Aniont (mg/l)	BQ-FF	DELTA	CRION	Q	SUD	BQ-D
Quinát	348	57,1	213	326	359	353
Glukuronát	3,70	11,9	20,0	18,8	6,30	3,70
Laktát	289	213	149	691	420	301
Shikimát/Glykolát/Acetát	4,40	14,9	15,4	2,20	1,60	4,20
Propionát	31,4	33,7	21,7	25,0	4,20	14,9
Isobutyrát	21,7	3,60	3,80	23,3	17,3	21,0
Butyrát	1,20	5,50	3,80	0,401	2,60	0,901
Pyruvát/Oxaloacetát	3,50	3,10	1,50	12,0	3,10	1,70
Isovalerát	203	214	187	342	213	206
Valerát	0,721	0,331	0,601	2,40	0,333	0,603
Glukuronát	0,411	0,332	0,412	0,403	0,413	n.d.
Glutarát/Mucic/Adipát	249	211	278	249	250	248
Malát/Succinát	345	2129	2030	435	302	356
Tartrát/Malonát	2249	3277	3283	2131	2439	2203
Maleát	1,70	42,3	64,5	1,90	1,20	1,10
α – ketoglutarát	1,90	2,10	2,70	2,80	3,10	3,90
Oxalát/Fumarát	42,0	26,8	20,4	18,0	12,7	11,2
Fosforečnan/Ftalát	485	546	548	668	490	452
Citrát	13,8	269	266	4,50	3,80	3,80
Isocitrát	26,9	26,6	26,4	25,1	26,0	23,2
Cis – akonitát	3,30	0,110	1,80	0,422	1,90	2,70
Trans – akonitát	1,00	0,201	1,20	0,701	0,921	1,10

V grafu číslo dva, udávající hodnoty naměřené v Rulandském šedém, si můžeme všimnout, že nejvyšší koncentrace dosáhl tartrát/malonát (2557 mg/l). V porovnání s ostatními hotovými víny, nikoliv tedy Stávkovými, bylo tohoto aniontu detekováno nejvíce právě v Rulandě. Ve velké míře zde byl naměřen i laktát (635 mg/l). Nejnižších koncentrací byla naměřena galakturonátu (0,20 mg/l).

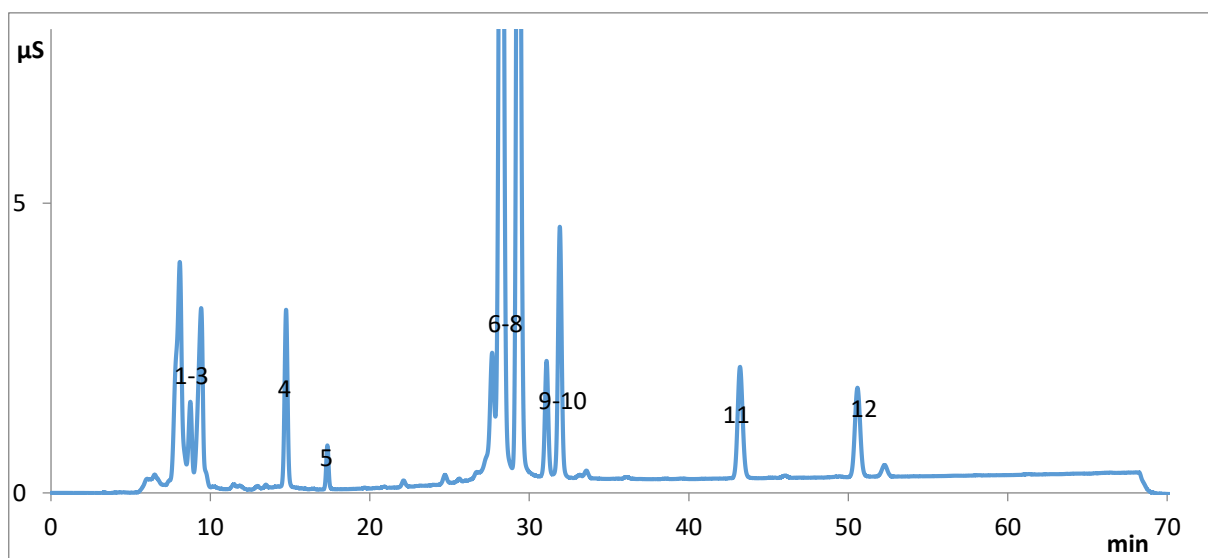


Graf 2: Koncentrace aniontů kyselin obsažených – Rulandské šedé (2017)

Graf číslo tři zobrazuje naměřené hodnoty v Ryzlinku rýnském (2017), kde nejvyšší koncentrace byla naměřena u malátu/succinátu (3401 mg/l). Tato hodnota byla nejvyšší v porovnání s ostatními detekovanými hotovými víny. Taktéž byly zaznamenány vysoké hodnoty glukonátu (317 mg/l), shikimátu/glykolátu/acetátu (718 mg/l), maleátu (187 mg/l) a citrátu (281 mg/l). Aniont kyseliny cis-akonitové nebyl téměř detekovatelný. Valerát a galaturonát se pohybovaly ve velmi nízkých koncentracích (0,212 mg/l). Koncentrace aniontů ve víně Ryzlinky rýnský (2017) je zobrazena chromatografem číslo tři.

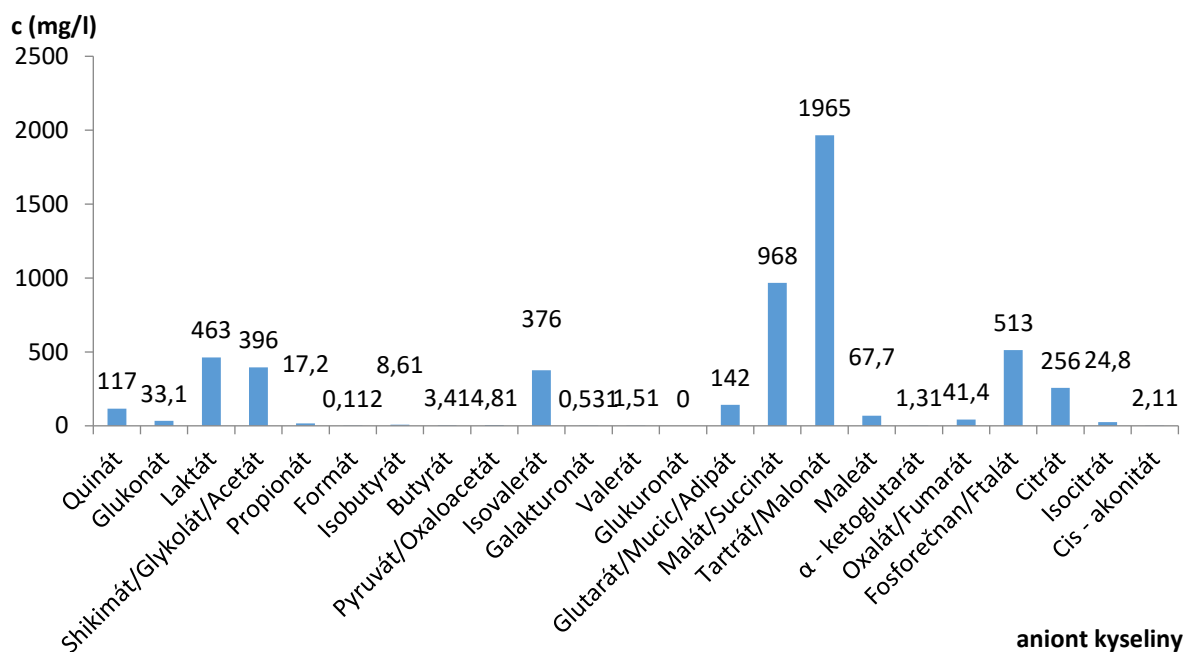


Graf 3: Koncentrace aniontů kyselin obsažených – Ryzlink rýnský (2017)



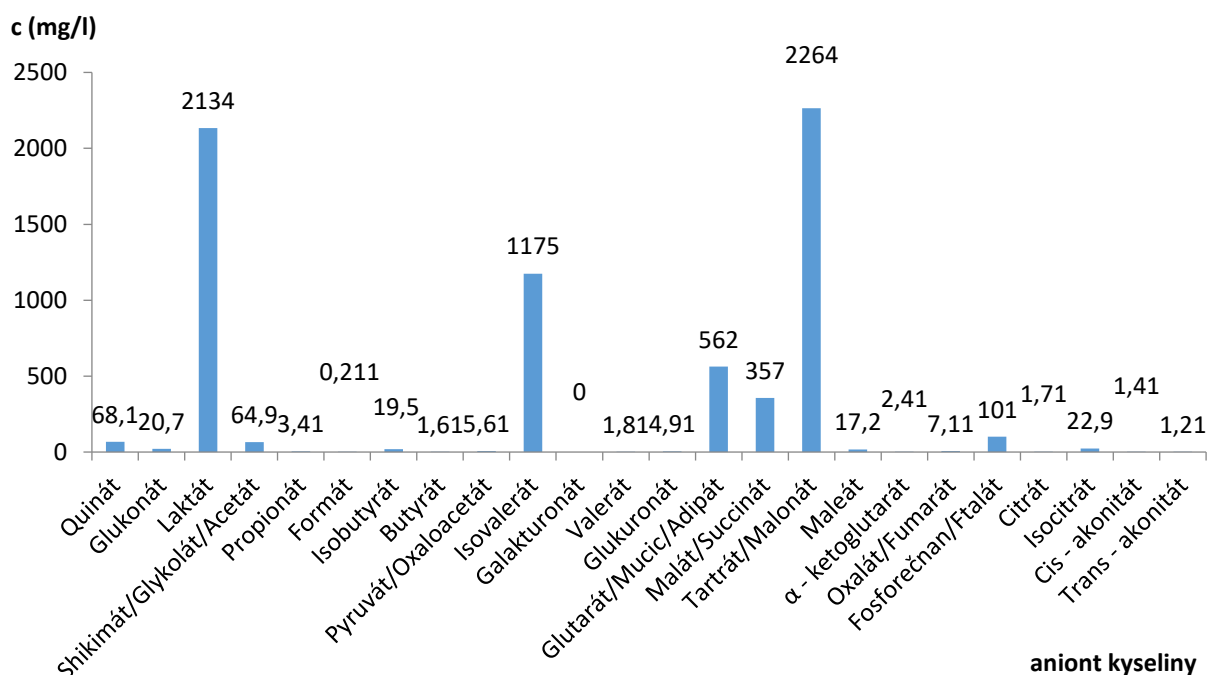
Chromatogram 2: Koncentrace aniontů kyselin – Ryzlink rýnský (2017): (1–3) glukonát, laktát, shikimát/glykolát/acetát; (4) isovalerát; (5) chlorid; (6–8) glutarát/mucic/adipát, malát/succinát, tartrát/malonát; (9–10) maleát, šiřičitan; (11) fosforečnan/ftalát; (12) citrát

Tetra-packové víno Rucio obsahovalo v porovnání s ostatními měřeními víny největší koncentraci quinátů (117 mg/l), fosforečnanů/ftalátů (513 mg/l), propionátů (17,2 mg/l), cis-akonitátů (2,11 mg/l) a oxalátů/fumarátů (41,4 mg/l). Glukuronát nebyl v tomto víně téměř detekovatelný. Tyto hodnoty jsou uvedeny v grafu čtyři.



Graf 4: Koncentrace aniontů kyselin – tetra-packové víno Rucio

Červené víno Dornfelder obsahovalo největší koncentraci aniontů kyseliny mléčné (2134 mg/l), glutarátu/mucic/adipátu (562 mg/l), isobutyrátu (19,5 mg/l), pyruátu/oxaloacetátu (5,61 mg/l) a isovalerátu (1175 mg/l) mezi námi měřenými víny. Vysokých hodnot dostal také aniont Valentu (1,81 mg/l) a glukuronátu (4,91 mg/l). Galakturonát se zde objevoval v nulových koncentracích. Naměřené výsledky jsou zaznamenány grafem pět.



Graf 5: Koncentrace aniontů kyselin – červené víno Dornfelder (2015)

Naměřené hodnoty formátu ve všech vínech byly téměř zanedbatelné. Nejvyšší jeho zaznamenané množství bylo u Ryzlinku rýnského (0,711 mg/l). Naměřené hodnoty těkavých kyselin v měřených hotových vínech, ve srovnání s legislativními hraničními limity pro bílá vína (1,11 g/l) vína a červená vína (1,21 g/l), byly obecně velmi nízké, viz kapitola 3.3.6. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce deset.

Tabulka 10: Těkavé kyseliny a jejich naměřené hodnoty ve vínech (mg/l)

Aniont kyseliny	Dornfelder	Rucio	Ryzlink	Rulandské
Butyřát	1,61	3,41	3,81	3,21
Propionát	3,41	17,2	12,1	15,6
Formát	0,211	0,112	0,711	0,111

6. Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo stanovit speciaci a kvantifikovat nízkomolekulární organické kyseliny ve vybraných druzích bílého vína pomocí iontově výměnné chromatografie. Účelem stanovování těchto kyselin je jejich vliv na organoleptické vlastnosti vinných nápojů.

Bylo zkoumáno devět různých vzorků bílého vína a nakonec byla analyzována i jedna odrůda červeného. Vzhledem k tomu, že některé organické kyseliny mají stejné retenční časy, nebylo možné, pouhou aplikací iontově výměnné chromatografie s konduktometrickým detektorem, tyto kyseliny od sebe odlišit. Píky koeluovaných kyselin jsou na chromatogramu znázorněny v překryvu.

Pro diferenciaci by bylo zapotřebí použití jiných detekčních a spektrometrických metod, jako jsou např. hmotnostní spektrometrie (MS), nukleární magnetická rezonance (NMR) nebo Fourierova transformace (Lachenmeier et al. 2005; Godelmann et al. 2013; Berbegal et al. 2019). Aplikace výše zmíněných metod nebyla pro psaní této diplomové práce dostupná, proto byly kyseliny určovány na základě srovnávání legislativních zákonů a jiných vědeckých publikací s naměřenými výsledky.

Mezi koeluované kyseliny patřil aniont shikimátu/glykolátu/acetátu. Romero a Munoz (1993) naměřili hodnoty kyseliny shikimátové v mladých bílých vínech od 15,94 mg/l do 30,90 mg/l a v červených od 16,12 mg/l do 40,59 mg/l, což se velmi odlišuje od hodnot, které byly změřeny pro tuto diplomovou práci. Kyselina shikimátová je dobře štěpitelnou kyselinou, která bývá využívána v Krebsově cyklu jako zdroj energie pro bakterie a kvasinky, v hotovém víně by tedy neměla být naměřena v nijak vysoké koncentraci (Hubová et al. 2017). Glykolát je toxická látka zaznamenávána u vín, u kterých je nezákonně přidáván diethylenglykol, jehož metabolitem je kyselina glykolová. Minimální toxická dávka se odhaduje na 0,14 mg kyseliny glykolové na kg tělesné hmotnosti a letální dávka se odhaduje mezi 1,0–1,63 g/kg tělesné hmotnosti. Proto je doporučené množství kyseliny glykolové a její farmaceuticky přijatelných solí nebo esterů zvolena tak, aby celkové glykolátové hladiny nepřekročily 0,20 mg glykolátu na kg tělesné hmotnosti (Pan-Montojo et al. 2019). Tyto hodnoty jsou opět v rozporu se mnou naměřenými hodnotami. Andorrá et al. (2019) uvádějí, že výskyt acetátu ve víně způsobují octové bakterie. Díky heterofermentativnímu kvašení je jeho přítomnost v některých případech nevyhnutelná, ale hladina je legislativně hlídána. Maximální povolená

koncentrace se pohybuje v rozmezí 0,3–0,6 g/l. V případě analyzovaných vín by tuto hodnotu přesáhl pouze Ryzlink rýnský, viz tab. 12.

Dalšími anionty se stejnými retenčními časy byly pyruát/oxaloacetát. Shapiro a Silanikova (2011) měřili kyseliny ve víně, ročník 2010, pomocí HPLC metody. V publikaci uvádí, že oxaloacetát nebylo u bílých vín možno detekovat, pouze u červených. Hodnoty pyruátu naměřili u bílých (okolo 0,142 mg/l) i u červených vín (okolo 0,448 mg/l). Mnou naměřené hodnoty u pyruátu/oxaloacetátu byly mnohem vyšší, avšak ročník vína (2015,2017,2017) hraje u obsahu kyselin velmi významnou roli. Zhang a Lovitt (2006) uvádějí, že výskyt pyruátu ve víně je více než obvyklý, neboť je součástí reakce přeměny kyseliny jablečné na laktát. V analyzovaných vínech byl tedy předpokládán výskyt pyruátu.

Ve vztahu malát/succinát byl předpokládán výskyt malátu. Kyselina jablečná je řazena mezi hlavní kyseliny vína, její výskyt je tedy více než pravděpodobný. Kyselina jablečná je u bílých vín částečně redukována a přeměňována na laktát důsledkem částečné malolaktické reakce, což způsobuje její zvýšenou koncentraci ve vínech. Hodnoty kyseliny jablečné, měřené HPLC metodou u bílých moštů, byly naměřeny od 1,43 do 3,40 g/l (Soyer et al. 2003; Milovanovic et al. 2019). Uvedené hodnoty kyseliny jablečné jsou více shodné s mými naměřenými výsledky, než koncentrace kyseliny jantarové. Moreno-Arribas a Polo (2009) publikují, že obsah kyseliny jantarové ve vínech se pohybuje v rozmezí od 0,6–1,2 g/l. Kandl a Kupina (1999) naměřili během separace pomocí kapilární elektroforézy s nepřímou UV detekcí během 13 minut 5–20 mg/l kyseliny jantarové v analyzovaném víně. Tyto hodnoty se neshodují s mými naměřenými hodnotami ve vztahu malát/succinát, viz tab. 12. Kyselina jantarová, stejně tak jako kyselina shikimátová, představuje v Krebsově cyklu zdroj energie pro mikroorganismy a bývá tedy rozkládána (Hubová et al. 2017).

Při koeluci aniontů tartrát/malonát byl zvolen výskyt tartrátu, protože kyselina vinná je stabilní látka, která patří spolu s kyselinou jablečnou a citrónovou mezi hlavní kyseliny vína. Může se objevovat v rozmezí 3–8 g/l (dle legislativy: ve víně 2–5mg/l, v moštu 3–7 mg/l). Kyselina malonová se částečně podílí na vinném aroma. Ve formě diethyl malonátu byla naměřena ve vzorcích vína z roku 2017 pomocí plynové chromatografie s QDA analyzátozem (detektor plynového pole). Množství se pohybovalo okolo 0,31 mg/l (Soyer et al. 2003; Sánchez-Palomo et al. 2019).

Kyselinu ftalovou spolu s fosforečnany od sebe také nebylo možné odlišit. Chatonnet et al. (2014), detekovali obsah ftalátů ve víně v mnohem nižších koncentracích, než uvádí moje

měření. Koncentrace ftalátů se během jejich výzkumu pohybovala v průměru okolo množství 0,0587 mg/l u bílých vín a 0,353 mg/l u vín červených.

Ve vztahu oxalát/fumarát, Lian et al. (1999) publikují studii, ve které poukazují na to, že se kyselina šťavelová díky nedostatku hydrofobních skupin objevuje na chromatogramu, při aplikaci iontově výměnné chromatografie, již před elučním činidlem. Přesnost analýzy oxalátu je tedy výrazně nižší, než přesnost analýzy fumarátu. Stejně tak v případě detekce oxalátu v ovocných šťávách byl výsledek špatně detekovatelný vzhledem k disociaci kyseliny při pH 2,10–2,15 (Chinnici et al. 2005). Kyselina šťavelová se vyskytuje v Krebsově cyklu, kde vzniká ze sukcinyl-CoA pomocí sukcinyl-CoA-syntetázy a mění se na fumarát díky enzymu sukcinátdehydrogenáza (Horák & Stazsková 2011). Předpokládá se tedy rozklad kyseliny šťavelové a její detekce ve vínech by měla být slabší než kyseliny fumarové. Romero a Munoz (1993) uvádějí, že pro stanovení kyseliny fumarové ve víně neexistuje žádná spektrofotometrická nebo enzymatická metoda. Množství kyseliny fumarové nakonec detekovali za použití reverzní vysokoúčinné kapalinové chromatografie s použitím kolony C₁₈. Naměřené hodnoty u bílého vína (22 vzorků) se pohybovaly v rozmezí 1,45–6,22 mg/l a u červeného vína (47 vzorků) 1,30–12,56 mg/l.

Poslední z koeluovaných aniontů byl mucic/adipát/glutarát. Ribéreau-Gayon (2006) uvádí, že výskyt kyseliny slizové způsobuje hniloba vinného nápoje. Přípustné množství pro víno je 0,1–0,5 g/l. Hniloba moštu nastává při množství vyšším než 2 g/l. Tuto hranici přesáhlo pouze víno Dornfelder, které nemělo zrovna ideální organoleptické vlastnosti. Na základě dostupných zjištění, jsou hodnoty kyseliny slizové nejvíce shodné s naměřenými výsledky, viz tab. 11. Adipáty jsou kontaminující látky požívané především jako změkčovadlo plastů nebo látka k uchování barvy. V případě, že je víno uchováno ve skle, je jejich výskyt téměř nulový. Cao (2008) uvádí, že se koncentrace adipátů ve vínech uchovávaných v plastech pohybuje kolem 20 µg/l. Mnou analyzovaná vína byla ve skleněných lahvích, kromě vzorků ze Stávkova vinařství, které byly v plastových. Víno Rucio bylo uchováno v tetra-packu. Berbegal et al. (2019) změřili za pomoci kapalinové chromatografie, koncentraci glutarátu ve víně velmi nízkou. Pohybovala se v množství okolo 30–50 µg/l.

Po diferenciaci kyselin bylo možné zkontrolovat, zda změřené hladiny koncentrací odpovídají předepsaným normám. Hodnoty některých kyselin značící nebezpečí nebyly ve víně vůbec detekovatelné. Nadlimitní množství (0,5 g/l), viz tabulka dva, by se v případě, že

by se jednalo o mucic, aniont kyseliny slizové, objevovalo pouze v červeném víně Dornfelder. Koncentrace kyseliny glukuronátové je u tohoto vína také v poměrně zvýšeném množství. Glukonát, značící výskyt šedé plísně, viz tabulka dva, se vyskytl v nejvyšším množství u tetra-packového vína Rucio. Anionty a jejich naměřené hodnoty zobrazuje tabulka jedenáct.

Tabulka 11: Kyseliny značící nebezpečí a jejich nameřené hodnoty ve vínech (mg/l)

Aniont kyseliny	Dornfelder	Rucio	Ryzlink	Rulandské
Glukonát	n.d.	6,41	0,51	0,21
Galakturonát	n.d.	0,51	0,21	0,21
Glukuronát	4,91	0	1,61	1,71
Mucic/Glutarát/Adipát	562	153	175	139

Změřené hodnoty legislativně hlídaných kyselin jsou zapsány v tabulce dvanáct, v tabulce třináct jsou jejich hodnoty dané legislativou. Pokud by se jednalo o aniont glykolátu, naměřená hodnota silně převyšuje danou hranici. Pokud by se jednalo o acetát, limity byly stanoveny v normě kromě koncentrace hladiny u vína Ryzlink. Ve vztahu malát/succinát splňují daný limit koncentrace odpovídající malátu, kdyby byly koncentrace vztaženy k succinátu, silně by převyšovaly. Naměřené množství koncentrace oxalátu by legislativně neodpovídalo pouze u tetra-packového vína Rucio. Velmi nízká hodnota citrátu byla naměřena u červeného vína Dornfelder.

Tabulka 12: Kyseliny kontrolované legislativou (mg/l)

Aniont kyseliny	Dornfelder	Rucio	Ryzlink	Rulandské
Laktát	344	214	405	231
Acetát/Glykolát/Shikimát	64,9	396	718	412
Malát/Succinát	357	974	3401	1767
Tartrát/Malonát	2264	2051	2223	2557
Oxalát/Fumarát	7,11	41,4	12,7	7,81
Citrát	1,71	256	281	209

Tabulka 13: Legislativní nařízení o množství kyselin ve víně, upraveno podle Ribéreau-Gayon 2006

Aniont kyseliny	Obsah kyseliny ve víně
Laktát	500 mg/l
Glykolát	0–20 mg/l
Acetát	300–600 mg/l
Malát/Succinát	0–5 000 mg/l / 500–1 500 mg/l
Tartrát	2 000–5 000 mg/l
Oxalát	0–30 mg/l
Citrát	50–500 mg/l

Výsledky získané z měření Stávkových vzorků pocházejí z vín, které ještě neprošly konečným stádiem vinifikace, proto nelze tvořit závěry na základě legislativních ustanovení nebo jiných vědeckých prací zabývajících se víny ve finální podobě. Balík a Stávek (2017) uvádí, že víno zraje po celou dobu výroby, až tedy finální hodnoty obecně rozhodují o sensorických vlastnostech. Rozdíly v nárůstu koncentrací kyselin byly tedy srovnávány mezi nimi samotnými, viz tabulka devět. Na těchto vzorcích bylo krásně znázorněno, jak vnější (místo zrání) i vnitřní (typ kvasinek) prostředí a technologické postupy významně ovlivňují organoleptické vlastnosti vína. Každé víno mělo jinou barvu, chuť i vůni. Vliv prostředí je velmi dobře znázorněn mezi vzorkem BQ-FF a BQ-D. Oba vzorky zrály v barikových sudech, každý vyrobený od jiné firmy a hladiny koncentrací u propionátu, α -ketoglutarátu, oxalátu/fumarátu a citrátu se významně lišily. Vliv kvasinek je znatelný mezi vzorky Delta a Crion. V tomto případě se prostředí nelišilo, pouze kvasná kultura. Hladiny shikimátu/glykolátu/acetátu, isobutyryátu, glukuronátu, fosforečnanu/ftalátu, isocitrátu a citrátu jsou podobné, ostatní se odlišovaly.

Vzhledem k tomu, že vína byla uchovávána v plastových lahvích, bylo by možné sledovat nárůst ftalátů spolu s acetáty, které jsou zdraví škodlivé a uvolňují se z plastů. Acetát je bohužel v koeluci s shikimátem/glykolátem a ftaláty mají stejný retenční čas s fosforečnanem. Nelze tedy stanovit přesné výsledky. Hladina shikimátu/glykolátu/acetátu byla nejvýše naměřena v hodnotě 15,4 mg/l. Pokud by se tedy jednalo o acetát, podle legislativy by bylo množství koncentrace přípustné, viz tab. 13. Hodnota ftalátu/fosforečnanu byla změřena oproti tomu, co uvádí jiné vědecké práce, ve velmi nízkém množství. Ftaláty by tedy u těchto vzorků vín také nepředstavovaly zdraví ohrožující riziko.

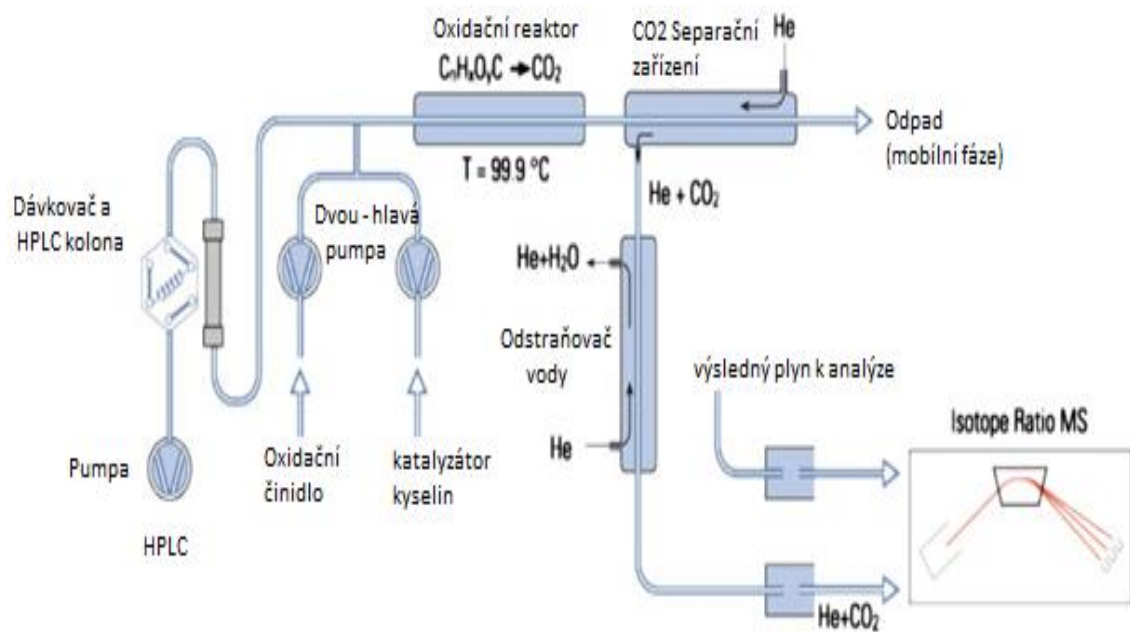
Veškeré zkratky vzorků s jejich vysvětlivkami, jsou uvedeny v tabulce osum.

Na základě změřených hladin koncentrací kyselin ve víně mohou vinaři technologicky upravovat svoje vína a profilovat je podle svých potřeb. Kromě toho bývá iontově výměnná chromatografie ve spojení s Fourierovou transformací (FTIR) také aplikována pro odhalování pančování alkoholových výrobků. Chromatografie stanovuje množství aniontů chloridů, dusičnanů, síranů, acetátů nebo oxalátů v nápoji a FTIR umožní rychlou detekci hustoty etanolu, metanolu a dalších těkavých látek. Srovnáním těchto výsledků s daným legislativním nařízením bývá identifikován falšovaný výrobek (Lachenmeier et al. 2005). Stanovení sacharidů (arabinóza, fruktóza, galaktóza, glukóza, manóza, ribóza, sacharóza aj.) za použití IC spojenou s pulzní amperometrickou detekcí můžeme prokázat falšovaná vína a instantní kávy (Bernal et al. 1996). Také hladina oxidu siřičitého (SO₂), používaného ke konzervačním účelům, podléhá legislativní regulaci. Za pomoci IC metody ve spojení s konduktometrickou detekcí, jak bylo použito při mých analýzách, bývá koncentrace SO₂ hlídána (Koch et al. 2010). Hojně využívanou aplikací je IC ve spojení s hmotnostním spektrometrem. Hmotnostní spektrometr separované látky identifikuje a odliší ty s podobnými vlastnostmi, jako jsou výše zmíněné koeluované anionty, které mají v daném prostředí stejnou velikost iontů, ale jinou hmotnost (Friedecký & Lemr 2012).

Pro prokázování kvality a původu vína bývá aplikována HPLC ve spojení s IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometer), viz obrázek sedmnáct. Při této metodě se využívá uhlíku, který se v přírodě nachází ve formě tří izotopů. Dva z nich jsou stabilní (C₁₂ a C₁₃) a jeden radioaktivní (C₁₄). HPLC s IRMS umožňuje analýzu izotopových poměrů v netěkavě vodných rozpustných organických sloučeninách, jako jsou sacharidy nebo aminokyseliny a tím odkrývá přidané množství organických kyselin nebo cukru (Guyon et al. 2014; Moerdijk-Poortvliet et al. 2014). Také HPLC ve spojení s nukleární magnetickou rezonancí (NMR) udává informace o odrůdě, původu, ročníku, fyziologickém stavu a o technologickém ošetření vína (Albert 2002; Godelmann et al. 2013). NMR dokáže rozlišit polohy uhlíku (vodíku) na organických molekulách a u každé zvlášť měřit zastoupení deuteria (C₁₃) (Košir et al. 2001).

Peres (2009) uvádí, že použití iontově výměnné chromatografie je kvůli nutnosti čištění vzorku u červeného vína omezeno. Tato metoda tedy není úplně vhodnou pro stanovování obsahu kyselin v červených odrůdách, proto bylo do analýzy zařazenou pouze jedno červené víno. Mnohem vhodnější je použití kapilární zónové elektroforézy s nepřímou UV detekcí, která byla aplikována pro určení organických kyselin v Portském víně nebo použití

elektroforésy s konduktometrickou detekcí na polymethylakrylátovém čipu (Esteves et al. 2004; Masar et al. 2005). Kapilární zónová elektroforéza s nepřímou UV detekcí byla použita i na analýzu bílých vín (Kandl & Kupina 1999).



Obrázek 17: Schéma Kapalinové chromatografie v kombinaci s IRMS

Zdroj: Moerdijk-Poortvliet et al. 2014

7. Závěr

Bylo změřeno šest vín stejné odrůdy ze Stávkovala vinařství na začátku jejich vinifikace, dvě bílá vína ročník 2017, jedno bílé víno ročník 2018 a jedno víno červené odrůdy ročník 2015. Rozdílné hladiny kyselin bylo patrné pozorovat především u vzorků vín ze Stávkovala vinařství, kdy každý vzorek zrál v odlišných nádobách s použitím různých kvasinek. Naměřené hodnoty kyselin byly velmi odlišné. U analyzovaných vzorků hotových vín byly zjištěny nejvyšší hladiny kyseliny vinné, jablečné a mléčné. Tyto tři kyseliny patří mezi hlavní kyseliny přítomné ve víně. Anionty těkavých kyselin, mezi které patří butyrát, formát a propionát, se objevovaly ve velmi nízkých koncentracích. Kyseliny značí nebezpečí, jako jsou glukonátová, galakturonátová, glukuronátová a slizová, se vyskytovaly vesměs v normě. Pouze kyselina slizová, u červeného vína Dornfelder, které bylo z organoleptického hlediska lehce táhlovité, byla mírně zvýšená. Stanovení červených odrůd vín pomocí IC není nemožné, ale není ani doporučené dle dostupné odborné literatury.

Pokud dvě látky opouští kolonu ve stejnou dobu (tj. mají stejný retenční čas), dochází na chromatogramu k překryvu píků (koeluci). Chromatografie je primární metodou separační, nikoliv detekční, a během identifikace kyselin se stejnými retenčními časy nebylo možné, za použití neselektivního vodivostního detektoru, od sebe tyto látky rozeznat. Na základě vědeckých prací, které se také zabývaly koncentrací kyselin ve víně, se můžeme domnívat, že v případě koeluce kyseliny shikimátové/glykolátové/octové, se jednalo o acetát. U koeluce malát/succinát byla předpokládána detekce malátu, tedy kyseliny jablečné a u tartrátu/malonátu výskyt kyseliny vinné. V analyzovaných vínech byla dána přednost výskytu fosforečnanů před toxickými ftaláty a ve vztahu oxaloacetát/pyruvát byla zvolena přítomnost pyruvátu. Ve vztahu oxalát/fumarát bylo učeno, že se jednalo o fumarát. Naměřené hladiny koncentrací kyselin byly nejvíce shodné ve vztahu glutarát/mucic/adipát s aniontem kyseliny slizové – mucic.

Ze získaných dat můžeme usoudit, že stanovení a kvantifikace nízkomolekulárních kyselin v různých odrůdách bílého vína pomocí iontově výměnné chromatografie je možné, ovšem její vhodnější použití by bylo v kombinaci s dalším detektorem (např. hmotnostním spektrometrem) pro přesnou specifikaci koelugovaných analytů.

8. Zdroje

Ailer Š. 2016. Vinárstvo a somelierstvo. Agriprint s.r.o., Olomouc.

Albert K. 2002. On-line LC-NMR and related techniques. J. Wiley, New York.

Amerine MA. 1981. Wine production technology in the United States. American Chemical Society, Washington, D. C.

Andorrá I, Miró G, Espligares N, Mislata AM, Puxeu M, Ferrer-Gallego R. 2019. Wild Yeast and Lactic Acid Bacteria of Wine. Intech Open (e84128) DOI: 10.5772/intechopen.84128.

Balík J. 1998. Vinařství – návody do laboratorních cvičení. MZLU, Brno.

Balík J, Stávek J. 2017. Vinařská technologie. Národní vinařské centrum, Valtice.

Balmaseda A, Bordons A, Reguant C, Bautista-Gallego J. 2018. Non-Saccharomyces in Wine: Effect Upon *Oenococcus oeni* and Malolactic Fermentation. *Frontiers in Microbiology* **9**: 534.

Barbe JC, Revel G, Perello MC, Lonvaud-Funel A, Bertrand A. 2007. Role of botrytized grape micro-organisms in SO₂ binding phenomena. *Journal of Applied Microbiology* **90**: 34–42.

Benítez P, Castro R, Barroso CG. 2002. Removal of iron, copper and manganese from white wines ion exchange techniques: effects on their organoleptic characteristics and susceptibility to browning. *Analytica Chimica Acta* **458**: 197–202.

Berbegal C, Polo L, García-Esparza MJ, Lizama V, Ferrer S, Pardo I. 2019. Immobilisation of yeasts on oak chips or cellulose powder for use in bottle – fermented sparkling wine. *Food Microbiology* **78**: 25–37.

Bernal JL, Nozal MJD, Toribio L, Alamo MD. 1996. HPLC Analysis of Carbohydrates in Wine and Instant Coffees Using Anion Exchange Chromatography Coupled to Pulsed Amperometric Detection. *Food Chemistry* **44**: 507–511.

- Bird D. 2010. *Understanding Wine Technology*. Gardners Book, San Francisco.
- Bravo S, Amorós JA, Pérez-de-los-Reyes C, García FJ, Moreno MM, Sánchez-Ormeno M, Higuera P. 2017. Influence of the soil pH in the uptake and bioaccumulation of heavy metals (Fe, Zn, Cu, Pb and Mn) and other elements (Ca, K, Al, Sr and Ba) in vine leaves, Castilla-La Mancha (Spain). *Journal of Geochemical Exploration* **174**: 79–83.
- Brice C, Cubillos FA, Dequin S, Camarasa C, Martines C. 2018. Adaptability of the *Saccharomyces cerevisiae* yeasts to wine fermentation conditions relies on their strong ability to consume nitrogen. *Plos ONE* 13 (e0192383)
DOI: 10.1371/journal.pone.0192383.
- Canoura C, Kelly MT, Ojeda H. 2018. Effect of irrigation and timing and type of nitrogen application on the biochemical composition of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and Syrah grapeberries. *Food Chemistry* **241**: 171–181.
- Cao XL. 2008. Determination of phthalates and adipate in bottled water by headspace solid – phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1178**: 231–238.
- Caruso A, Santoro M. 2013. Rapid, Automated, and Accurate Determination of Volatiles in Human Blood by Headspace Gas Chromatography. Thermo Fisher Scientific, Milan.
- CAS. 2019. *Solve Scientific Information Challenges*. American Chemical Society, Chicago. Available from <https://www.cas.org/> (accessed March 2019).
- Contreras A, Hidalgo C, Henschke PA, Chambers PJ, Curtin C, Varela C. 2014. Evaluation of non- *Saccharomyces* yeast for the reduction of alcohol content in wine. *Applied and Environmental Microbiology* **80**: 1670–1678.
- Cordente AG, Curtin CD, Varela C, Pretorius IS. 2012. Flavour – active wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* **96**: 601–618.
- Darrieussecqová F, Denturcková M. 2018. *Vinografie – Poznejte víno*. Grada, Praha.

- Davídek J. 1991. *Chemie potravin*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha.
- Deiana AC, Sardella MF, Silva H, Amaya A, Tancredi N. 2009. Use of grape stalk a waste of the viticulture industry, to obtain activated carbon. *Journal Of Hazardous Materials* **172**: 13–19.
- DonauMedia. 2008. *Vinařství a vína České republiky*. DonauMedia, s.r.o., Bratislava.
- Doonan BB, Iraj S, Pellegrino L, Hsieh TC, Wu JM. 2017. The French paradox revisited: cardioprotection via hormesis, red wine and resveratrol. *Human Health Handbooks* **14**: 467–485.
- Esteves VI, Lima SSF, Lima DLD, Duarte AC. 2004. Using capillary electrophoresis for the determinativ of organic acids in Port wine. *Analytica ACTA* **513**: 163–167.
- Fic V. 2015. *Víno: analýza, technologie, gastronomie*. THETA, Český Těšín.
- Friedecký D, Lemr K. 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab* **20**: 152–157.
- Gawel R, Schulkin A, Smith P, Kassara S, Francis L, Herderich M, Johnson D. 2018. Influence of wine polysaccharides on white and red wine mouthfeel. *Wine and Viticulture Journal* **33**: 34–37.
- GE Healthcare Life Sciences. 2016. *Fundamentals of ion exchange chromatography*. Available from <https://www.gelifesciences.com/en/us/solutions/protein-research/knowledge-center/protein-purification-methods/ion-exchange-chromatography> (accessed January 2019).
- Giddings J, Cazes J. 2002. *Dynamics of Chromatography*. Boca Raton, Florida.
- Godelmann R, Fang F, Humpfer E, Schutz B, Bansbach M, Schafer H, Spraul M. 2013. Targeted and nontargeted wine analysis by H NMR spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. Differentiation of important parameters: grape variety, geographical origin, year of vintage. *Food Chemistry* **61**: 5610–5619.

Guyon F, Auberger P, Gaillard L, Loublanches C, Viateau M, Sabathié N, Salagoity MH, Médina B. 2014. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio of organic acids, glucose and fructose determined by HPLC – co – IRMS for lemon juices authenticity. *Food Chemistry* **146**: 36–40.

Harvey D. 2016. *General Theory of Column Chromatography*. Chemistry LibreTexts. Available from [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_\(Harvey\)/12_Chromatographic_and_Electrophoretic_Methods/12.2%3A_General_Theory_of_Column_Chromatography#title](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/12_Chromatographic_and_Electrophoretic_Methods/12.2%3A_General_Theory_of_Column_Chromatography#title) (accessed December 2018).

Hayenga I. 2018. *Determination of Organic Acids in Wine and Fruit Juices with Ion Exclusion Chromatography*. SigmaDrich. Available from <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytix/determination-of-organic.html> (accessed December 2018).

Horák V, Stazsková L. 2011. *Biochemie*. Powerprint s.r.o., Praha 6 – Suchbátka.

Hubová P, Tejnecký V, Ash Ch, Borůvka L, Drábek O. 2017. Low-Molecular-Mass Organic Acids in the Forest Soil Environment. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* **14**: 75–84.

Chatonnet P, Boutou S, Plana A. 2014. Contamination of wines and spirits by phthalates: types of contaminants present, contamination sources and means of prevention. *Food Additives and Contaminants: Part A* **31**: 1605–1615.

Chen WK, He F, Wang YX, Liu X, Duan CQ, Wang J. 2018. Influence of berry size on fruit composition and wine quality of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon Grapes. *South African Journal of Enology and Viticulture* **39**: 1–10.

Cheriyedath S. 2016. How does ion exchange Chromatography work? *News medical life science*. Available from <https://www.news-medical.net/life-sciences/How-Does-Ion-Exchange-Chromatography-Work.aspx> (accessed November 2018).

Chinnici F, Spinabelli U, Riponi C, Amati A. 2005. Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis* **18**: 121–130.

- International organisation of vine and wine. 2019. Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. OIV - 18, rue d'Aguesseau, Paris.
- Jackson RS. 2008. Wine Science: Principles and Applications. Elsevier, Amsterdam.
- Janča J. 1996. Herbář léčivých rostlin (5). Eminent nakladatelství, Brno.
- Kandl T, Kupina S. 1999. An improved capillary electrophoresis procedure for determination of organic acids in grape juice and wine. American journal of enology and viticulture **50**: 155–161.
- Koch M, Köppen R, Siegel D, Witt A, Nehls I. 2010. Determination of Total Sulfite in Wine by Ion Chromatography after In-Sample Oxidation. Food Chemistry **58**: 9463–9467.
- Komise evropských společenství. 2009. NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 607/2009 ze dne 14. července 2009, kterým se stanoví některá prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 479/2008, pokud jde o chráněná označení původu a zeměpisná označení, tradiční výrazy, označování a obchodní úpravu některých vinařských produktů. Pages 64–66. Nařízení komise, Česká republika.
- Kopeček J, Kraus V. 2012. Setkání s vínem. Radix, Kutná Hora.
- Kordiš-Krapež M, Abram V, Kač M, Ferjančič S. 2001 Determination of Organic Acids in White Wines by RP-HPLC. Food technol. Biotechnol **39**: 93–99.
- Korytár P, Janssen HG, Matisová E, Brinkman UAT. 2002. Practical fast gas chromatography: methods, instrumentation and applications. Elsevier **21**: 558–572.
- Košir IJ, Kocjančič M, Ogrinc N, Kidrič J. 2001. Use of SNIF-NMR and IRMS in combination with chemometric methods for the determination of chaptalisation and geographical origin of wines (the example of Slovenian wines). Analytica Chimica Acta **429**: 195–206.
- Kotani A, Miyaguchi Y, Tomita E, Takamura K, Kusu F. 2004. Determination of Organic Acids by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection during Wine Brewing. Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**: 1440–1444.

- Krata A, Kontozova-Deutsch V, Bencs L, Deutsch F, Grieken R. V. 2009. Single-run ion chromatographic separation of inorganic and low-molecular-mass organic anions under isocratic elution: Application to environmental samples. *Nutrition: X* **79**: 16–21.
- Kraus V. 2005. *Nová encyklopedie českého a moravského vína: 1. Díl*. Praga Mystica, Praha 1.
- Kraus V. 2009. *Vinitorium historicum*. Radix, Praha
- Kraus V, Foffová Z, Vurm B. 2008. *Nová encyklopedie českého a moravského vína: 2. Díl*. Praga Mystica, Praha 1.
- Kuttelvašer Z. 2003. *Abeceda vína*. Radix, Praha.
- Lachenmeier DW, Richling E, López MG, Frank W, Schreier P. 2005. Multivariate Analysis of FTIR and Ion Chromatographic Data for the Quality Control of Tequila. *Food Chemistry* **53**: 2151–2157.
- Lian HZ, Mao L, Ye XL, Miao J. 1999. Simultaneous determination of oxalic, fumaric, maleic and succinic acids in tartaric and malic acids for pharmaceutical use by ion-suppression reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **19**: 621–625
- Liang Ch, Lucy ChA. 2010. Characterization of ion chromatography columns based on hydrophobicity and hydroxide eluents strength. *Journal of Chromatography A* **1217**: 8154–8160.
- Lorrain B, Ky I, Pechamat L, Teissedre PL. 2013. Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines and extracts. *Molecules* **18**: 1076–1100.
- Magyar I, Bene Z. 2006. Morphological and taxonomic study on mycobiota of noble rotted grapes in the Tokaj wine district. *Acta Alimentaria* **36**: 329–341.
- Major R. 2013. Ion Chromatography: Yesterday, Today, and Tomorrow. *Advances in ion chromatography* **31**: 7.

Marrano A, Micheletti D, Lorenzi S, Neale D, Grando MS. 2018. Genomic signatures of different adaptations to environmental stimuli between wild and cultivated *Vitis vinifera* L. *Horticulture Research* **5**: 1–12.

Masar M, Polaikova K, Dankova M, Kaniansky D, Stanislavski B. 2005. Determination of organic acids in wine by zone electrophoresis on a chip with conductivity detection. *Journal of separation science* **28**: 905–914.

Milovanovic M, Žeravík J, Obořil M, Pelcová M, Lacina K, Cakar U, Petrovic A, Glatz Z, Skládal P. 2019. A novel method for classification of wine based on organic acids. *Food Chemistry* **284**: 296–302.

Moerdijk-Poortvliet TCW, Stal LJ, Boschker HTS. 2014. LC/IRMS analysis: A powerful technique to trace carbon flow in microphytobenthic communities in intertidal sediments. *Journal of Sea Research* **92**: 19–25.

Moreno-Arribas MV, Polo MC. 2009. *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer, New York.

Munitz S, Netzer Y, Shtein I, Schwartz A. 2018. Water availability dynamicz have long – term effects on mature stem structure in *Vitis vinifera*. *American Journal of Botany* **105**: 1443–1452.

Murray RK, Granner DK, Davis JC, Mayes PA, Rodwell WV. 2003. *Harper’s Illustrated Biochemistry*. McGraw – Hill Companies, United States.

Niessen WMA, Tinke AP. 1995. Liquid chromatography – mass spektrometry. General principles and instrumentation. *Journal of Chromatography* **703**: 37–57.

Nováková L, Vlčková H. 2009. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica acta* **656**: 8–35.

Oberbeckmann-Winter N. 2018. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Springer – Verlag, Berlin.

- Oliveira CM, Silva Ferreira AC, De Freitas V, Silva AMS. 2011. Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International* **44**: 1115–1126.
- Pan-Montojo F, Kurzchalia T, Hyman AA. 2019. Glycolic acid enhances sperm mobility. *United States Patent* **1**: 1–7.
- Pavloušek P. 2008. *Encyklopedie révy vinné*. Computer Press, Brno.
- Pavloušek P. 2010. *Výroba vína u malovinařů*. Grada Publishing, a.s., České Budějovice.
- Pavloušek P, Burešová P. 2015. *Vše co byste měli vědět o víně a nemáte se koho zeptat*. Grada Publishing, a.s., Havlíčkův Brod.
- Peres RG. 2009. Method for determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Kontrol* **20**: 548–552.
- Pragolab. 2018. *Acclaim Organic Acid – kolony pro analýzu organických kyselin*. Pragolab s.r.o. Available from <https://www.pragolab.cz/acclaim-organic-acid---kolony-pro-analyzu-organickykh-kyselin> (accessed November 2018).
- Prusisz B, Mulica K, Pohl P. 2008. Ion Exchange and Ion Exclusion Chromatographic Characterization of Wines Using Conductivity Detection. *Journal of Food and Drug Analysis* **16**: 95–103.
- Radeka S, Herjavec S, Peršurič D, Lukič I, Sladonja B. 2007. Effect of Different Maceration Treatments on Free and Bound Varietal Aroma Compounds in Wine of *Vitis vinifera* L. cv. Malvazija istarska bijela. *Aroma Compounds, Food Technol. Biotechnol* **46**: 86–92.
- Ribéreau-Gayon P. 2006. *Handbook of enology: The chemismy of wine stabilization and treatments*. Chichester John Wiley and Son, New York.
- Riemenschneider W, Tanifuji M. 2011. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemismy*. Wiley-VCH, Weinheim.

Romero EG, Munoz GZ. 1993. Determination of organic acids in grape musts, wines and vinegars by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **655**: 111–117.

Rupnik-Cigoj M, Jež-Krebelj A, Castellarin SD, Trošt K, Sivilotti P, Pompe-Novak M. 2018. Grapevine fanleaf virus affects grape (*Vitis vinifera*) berry anthocyanin content via the transcriptional regulation of anthocyanin biosynthetic genes. *Functional Plant Biology* **45**: 771–782.

Sánchez-Palomo E, Delgado JA, Ferrer MA, Gonzáles Viñas MA. 2019. The aroma of La Mancha Chelva wines: Chemical and sensory characterization. *Food Research* **119**: 135–142.

Shapiro F, Silanikova N. 2011. Rapid and accurate determination of malate, citrate, pyruvate and oxaloacetate by enzymatic reactions coupled to formation of a fluorochromophore: Application in colorful juices and fermentable food (yogurt, wine) analysis. *Food Chemistry* **129**: 608–613.

Shimadzu. 2019. Important Points about Ion Chromatography..pH is Tricky. Shimadzu Corporation. Available from <https://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/42lab.html> (accessed January 2019).

Schalley CA. 2003. *Modern Mass Spectrometry*. Springer – Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. KG. Berlin, Berlin.

Skelton S. 2007. *Viticulture: an introduction to commercial grape growing for those in the wine-trade, students taking the WSET diploma and Master of Wine candidates*. Stephen Skelton, London.

Skouroumounis GK, Kwiatkowski MJ, Francis IL, Oakey H, Capone DL, Duncan B, Sefton MA, Waters EJ. 2008. The impact of closure type and storage conditions on the composition, colour and flavour properties of a Riesling and a wooded Chardonnay wine during five years' storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **11**: 369–384.

Soyer Y, Koca N, Karadeniz F. 2003. Organic acid profile of Turkish white grapes and grape juices. *Journal of Food Composition and Analysis* **16**: 629–636.

Stávek J. 2002. Aroma vína a sloučeniny síry. *Vinařský obzor* **12**: 41–43.

Styger G, Prior B, Bauer FF. 2011. Wine flavor and aroma. *Journal of industrial microbiology and biotechnology* **38**: 1145–1159.

Štulík K. 2004. Analytické separační metody. Nakladatelství Karolinum, Praha.

Thermo Fisher Scientific. 2012. Dionex ICS – 4000 Capillary HPLC System. Thermo Fisher Scientific, United States.

Thomidis T, Zioziou E, Koundouras S, Navrozidis I, Nikolaou N. 2018. Effect of prohexadione-Ca on leaf chlorophyll content, gas exchange, berry size and composition, wine quality and disease susceptibility in *Vitis vinifera* L. cv Xinomavro. *Scientia Horticulturae* **238**: 369–374.

Unwin T. 1996. *Wine and the vine: an historical geography of viticulture and the wine trade*. Routledge, London.

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, dále jen „Ústav“, podle ustanovení § 33 odst. 4 zákona č. 219/2003 Sb., o uvádění do oběhu osiva a sadby pěstovaných rostlin a o změně některých zákonů (zákon o oběhu osiva a sadby), ve znění pozdějších předpisů, dále jen „zákon“, vydává seznam všech odrůd pěstovaných rostlin zapsaných ve Státní odrůdové knize ke dni 15. 6. 2017, včetně údajů o adresách jejich udržovatelů, držitelů šlechtitelských práv podle zákona č. 408/2000 Sb., o ochraně práv k odrůdám, ve znění pozdějších předpisů, a zmocněných zástupců. Pages 43–45 in *Věstník ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského, Česká republika*.

Vína z Moravy Vína z Čech. 2018. Dornfelder 2015. Vinařský fond. Available from <https://www.wineofczechrepublic.cz/nasi-vinari/vino-na-dotek/vino/276892-dornfelder-2015.html> (accessed March 2019).

Volka K. 1995. Analytická chemie II. VŠCHT, Praha.

Vrbová T. 2008. Víme, co jíme?, aneb: Průvodce "Ěčky" v potravinách. EcoHouse, Praha.

Watrex. 2017. Iontová chromatografie. Watrex Praha s.r.o., Praha. Available from <http://watrex.com/index.php/cs/produkty/hplc-kolony/analytick%C3%A9-kolony/iontova-chromatografie> (accessed March 2019).

Winkler AJ, Cook JA, Kliewer WM, Lider LA, Cerruti L. 1974. General viticulture. University of California Press, Berkeley.

Zareei E, Javadi T, Aryal R. 2018. Biochemical composition and antioxidant activity affected by spraying potassium sulfate in black grape (*Vitis vinifera* L. cv. Rasha). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **98**: 5632–5638.

Zhang D, Lovitt RW. 2006. Review Strategies for enhanced malolactic fermentation in wine and cider maturation. *Journal of Chemical, Technology and Biotechnology* **81**: 1130–1140.

Zhang X, Lan Y, Zhu B, Xiang X, Duan C, Shi Y. 2017. Changes in monosaccharides, organic acids and amino acids during Cabernet Sauvignon wine ageing based on a simultaneous analysis using gas chromatography-mass spectrometry. *Science of food and agriculture* **98**: 104–112.

Znovín Znojmo, a.s. 2018. Katalog vín, služeb a informací. Bravissimo, Šatov.