

Možnosti fluorescenční analýzy při analýze vín

Bc. Tereza Šťastná

Diplomová práce
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza Šťastná**
Osobní číslo: **T170072**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Možnosti fluorescenční analýzy při analýze vín**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Víno a jeho složení.
2. Výroba vína u malovinařů a hodnocení vína.
3. Fluorescenční spektrometrie.
4. Vybrané metody analýzy tichých vín.

II. Praktická část

1. Optimalizace postupů stanovení různých odrůd vín pomocí fluorescenční spektrometrie.
2. Stanovení antokyaninů a polyfenolických látek ve víně pomocí HPLC.
3. Vyhodnocení a diskuze výsledků.
4. Formulace závěrů práce.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] JACKSON, R. S. *Wine Science: Principles and Applications*. 3rd ed. Elsevier, 2008. ISBN 978-0-12-373646-8.

[2] RIBEREAU-GAYON, P., D. DUBOURDIEU, Y. GLORIES a A. MAUJEAN. *Handbook of enology: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, 2006. ISBN 978-0-470-01037-2.

[3] The International Organisation of Vine and Wine: *Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts (2 vol.)* [online]. Paris: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, 2015.

[4] BALÍK, J. *Anthokyaninová barviva v hroznech a vínech: Anthokyanin pigments in grapes and wines*. Vyd. 1. Brno: Mendlova univerzita v Brně, 2010, 108 s. ISBN 978-80-7375-412-9.

[5] ROUESSAC, F. A. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. 2nd ed. Chichester: Wiley, 2007, xxiii, 574 s. ISBN 978-0-470-85903-2.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Mgr. Barbora Lapčíková, Ph.D.**
Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce: **2. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **3. května 2019**

Ve Zlíně dne 2. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Jiří Miček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno:

Obor:

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byla jsem seznámena/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlázení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, oписy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užíje-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³¹⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlíádne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá možnostmi fluorescenční analýzy při analýze tichých vín. Teoretická část obsahuje chemické složení vína z pohledu těkavých a netěkavých složek, výrobu vína u malovinařů včetně jeho hodnocení. Dále je v této části popsána fluorescenční spektrometrie a vybrané metody analýzy tichých vín. V praktické části byly analyzovány a hodnoceny vzorky vín z různých vinařských oblastí metodami fluorescenční analýzy a pro srovnání či doplnění byly stanoveny hodnoty koncentrace polyfenolických látek, intenzity fluorescenčního záření, hustoty a dalších parametrů. Na základě získaných dat byla prokázána rozdílná koncentrace polyfenolických sloučenin ve vzorcích vín totožné odrůdy, ale pocházející z rozdílných vinařských oblastí. Naopak hustota těchto vín byla ze statistického hlediska nezávislá na jejich původu a odrůdě.

Klíčová slova: fluorescenční spektrometrie, analýza tichých vín, malovinaři, HPLC, UV/VIS

ABSTRACT

The thesis deals with the possibilities of fluorescence analysis in the analysis wines. The theoretical part contains the chemical composition of the wine from the point of view of volatile and non-volatile components, the production of wine by small producers including its evaluation. Furthermore, fluorescence spectrometry and selected methods of wine analysis are described in this section. In the practical part, the samples of wines from different wine regions were analyzed and evaluated by the methods of fluorescence analysis and for comparison or completion the values of concentration of polyphenolic substances, intensity of fluorescent radiation, density and other parameters were determined. On the basis of the data obtained, a different concentration of polyphenolic compounds in wine samples of the same variety, but originating from different wine regions, was demonstrated. On the contrary, the density of these wines was statistically independent of their origin and variety.

Keywords: fluorescence spectrometry, silent wine analysis, small producers of wine, HPLC, UV / VIS

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala vedoucí své diplomové práce paní doc. Mgr. Barboře Lapčíkové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a důvěru, kterou do mě vložila. Poděkování patří také Ing. Tomáši Valentovi, Ph.D., za praktickou pomoc při zpracování výsledků. Děkuji za spolupráci s Ústavem analýzy a chemie potravin doc. Ing. Daniele Sumczynski, Ph.D., za umožnění využití kapalinového chromatografu a spektrofotometru a Ing. Lence Fojtíkové a Ing. Sytařové za cenné rady a pomoc při měření. V neposlední řadě děkuji rodině za trpělivost a podporu.

Díky patří také otci Josefu Šťastnému za poskytnutí vzorků vín z jeho vinice v Petrově, panu Machlicovi a Zelenkovi za poskytnutí vzorků vín ze Slovenska a paní Kateřině Svatoňové za zprostředkování vzorku vína z Rakouska.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD..... | 10 |
| I TEORETICKÁ ČÁST..... | 11 |
| 1 CHEMICKÉ SLOŽENÍ VÍNA | 12 |
| 1.1 TĚKAVÉ SLOŽKY | 12 |
| 1.1.1 Alkoholy..... | 12 |
| 1.1.2 Aromatické látky | 13 |
| 1.1.3 Těkavé kyseliny | 13 |
| 1.1.4 Oxid siřičitý..... | 14 |
| 1.2 NETĚKAVÉ SLOŽKY | 14 |
| 1.2.1 Sacharidy..... | 15 |
| 1.2.2 Glycerol..... | 15 |
| 1.2.3 Netěkavé kyseliny | 15 |
| 1.2.4 Minerální látky | 15 |
| 1.2.5 Polyfenolické látky..... | 16 |
| 1.2.6 Dusíkaté látky..... | 17 |
| 1.2.7 Vitaminy..... | 17 |
| 2 VÝROBA VÍNA U MALOVINAŘŮ A HODNOCENÍ VÍNA..... | 18 |
| 2.1 LEGISLATIVA..... | 18 |
| 2.2 VÝROBA BÍLÉHO A ČERVENÉHO VÍNA..... | 19 |
| 2.2.1 Sklizeň hroznů a jejich zpracování | 19 |
| 2.2.2 Alkoholová fermentace | 21 |
| 2.2.3 Výroba červených vín | 24 |
| 2.2.4 Odkyselování..... | 25 |
| 2.2.5 Školení vína..... | 25 |
| 2.2.6 Zrání a skladování vína | 26 |
| 2.3 HODNOCENÍ VÍNA..... | 27 |
| 2.3.1 Senzorické hodnocení | 28 |
| 2.3.2 Analytické hodnocení vína..... | 28 |
| 3 FLUORESCENČNÍ SPEKTROMETRIE | 30 |
| 3.1 FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE..... | 30 |
| 3.2 VYUŽITÍ FLUORESCENČNÍ SPEKTROMETRIE | 32 |
| 4 VYBRANÉ METODY ANALÝZY TICHÝCH VÍN..... | 33 |
| 4.1 METODA HPLC..... | 33 |
| 4.2 SPEKTROFOTOMETRIE UV/VIS | 33 |
| 4.3 STANOVENÍ POLYFENOLICKÝCH LÁTEK S ČINIDLEM FOLIN-CIOCALTEU | 35 |
| 5 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE | 37 |
| II PRAKTICKÁ ČÁST | 38 |
| 6 METODIKA | 39 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 6.1 | CHEMIKÁLIE A POMŮCKY | 39 |
| 6.2 | CHARAKTERISTIKA VZORKŮ..... | 40 |
| 6.3 | ANALÝZA VÍNA POMOCÍ FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE..... | 41 |
| 6.4 | STANOVENÍ POLYFENOLICKÝCH LÁTEK POMOCÍ HPLC..... | 41 |
| 6.4.1 | Extrakce a příprava vzorku | 41 |
| 6.4.2 | Stanovení kalibračních křivek..... | 41 |
| 6.4.3 | Chromatografické stanovení polyfenolických kyselin..... | 41 |
| 6.5 | DOPLŇUJÍCÍ STANOVENÍ | 42 |
| 6.5.1 | Analýza vína pomocí spektroskopie UV/VIS | 42 |
| 6.5.2 | Stanovení polyfenolů ve vínech s činidlem Folin-Ciocalteu..... | 43 |
| 6.5.3 | Stanovení hustoty vína pyknometricky | 43 |
| 7 | VYHODNOCENÍ A DISKUZE VÝSLEDKŮ | 45 |
| 7.1 | VÝSLEDKY STANOVENÍ VÍN POMOCÍ FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE | 45 |
| 7.2 | VÝSLEDKY STANOVENÍ POLYFENOLICKÝCH LÁTEK POMOCÍ HPLC..... | 46 |
| 7.3 | OSTATNÍ VÝSLEDKY STANOVENÍ | 50 |
| 7.3.1 | Výsledky spektrofotometrického stanovení polyfenolických látek UV/VIS | 50 |
| 7.3.2 | Výsledky stanovení polyfenolických látek ve vínech s činidlem Folin- Ciocalteu | 51 |
| 7.3.3 | Výsledky stanovení hustoty vína pyknometricky | 52 |
| 7.4 | SOUHRNNÁ DISKUZE VÝSLEDKŮ..... | 53 |
| 7.5 | STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT | 57 |
| | ZÁVĚR | 61 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 62 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK..... | 69 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ | 70 |
| | SEZNAM TABULEK..... | 71 |
| | SEZNAM PŘÍLOH..... | 72 |

ÚVOD

Malovinaři jsou neustále se zdokonalující výrobci vín, kteří nejsou ovlivněni veřejností a velkým trendům, ale většinou preferují vína získaná vlastní cestou a zachovávají tradice výroby. Vína vyrobená malovinaři jsou odlišná od velkovýrobců s potřebami vyniknutí na trhu a zavděčení se spotřebitelům za každou cenu.

V současné době probíhá intenzivní studium zabývající se spektroskopickou charakteristikou tichých vín. Tento typ vína je z komerčního hlediska nejrozšířenějším druhem vína dostupným na světovém trhu.

Specifickou látkou přítomnou v tichých vínech jsou polyfenolické sloučeniny. Tyto sloučeniny je možné detekovat s využitím různých měřících technik. V případě této diplomové práce byly využity také spektroskopické metody stanovení excitačně-emisních profilů, absorbance a metody kapalinové chromatografie.

Fluorescenční spektra jsou zaznamenávána ihned po otevření lahve a mohou poskytnout různé informace o původu vzorku. Fluorescenční spektroskopie není dosud obvyklou metodou v oblasti výzkumu potravin, a proto bylo cílem předkládané práce dokázat její praktickou aplikovatelnost na vzorcích vybraných tichých vín.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHEMICKÉ SLOŽENÍ VÍNA

Víno je složeno z mnoha těkavých i netěkavých sloučenin rozpuštěných ve vodě, které rozhodují o organoleptických vlastnostech vína. Tyto sloučeniny pochází již ze sklizených hroznů. Charakter vína je ovlivněn odrůdou, klimatem, půdními podmínkami vinice (terroir) a způsobem pěstování, zralostí hroznů a jejich zdravotním stavu při sklizni. Látkové složení vína se vytváří a mění během celé technologie výroby a skladování vína kvůli biochemickým, chemickým a mikrobiálním procesům. Největší podíl objemu vína tvoří voda, je zde zastoupena v 70 až 90 %. Druhým zástupcem v pořadí je etanol, který tvoří 7 až 15 %, avšak u některých velmi sladkých vín můžeme narazit na větší podíl zbytkového cukru než etanolu. Zbylé látky ovlivňující plnost chuti vína označujeme jako extrakt vína v zastoupení od 1 do 15 % [1].

1.1 Těkavé složky

Takové látky, které se dají oddělit varem. Jejich zastoupení zásadně ovlivňuje aroma vína [1].

Tab. 1: Obsah některých těkavých látek ve víně [1]

| Těkavé složky | (g/l) |
|-----------------------|-----------|
| Alkohol | 55–120 |
| Vyšší alkoholy | 0,2–9,8 |
| Aldehydy a ketony | 0,01–0,1 |
| Těkavé kyseliny | 0,1–2,1 |
| Jiné aromatické látky | 0,001–0,1 |
| Oxid siřičitý | 0,01–0,4 |

1.1.1 Alkoholy

Etanol je zastoupen v největším množství. Ovlivňuje řadu produkovaných aromatických látek ve víně a má konzervační účinek, jelikož potlačuje rozmnožovací činnost kvasinek. Vzniká jako hlavní produkt alkoholovou fermentací přeměnou přítomných zkvasitelných cukrů pomocí kvasinek. Zkvasitelnými cukry jsou v tomto případě především glukóza a

fruktóza. Vinaři mohou přidávat také sacharózu. Tyto cukry se v průběhu fermentace mění na etanol a oxid uhličitý. Obecně platí, že ze 100 g cukru glukózy lze vytvořit až 51,11 g etanolu (ve skutečnosti méně z důvodu vzniku jiných meziproduktů a tepla). Nejčastější obsah alkoholu ve vínech se pohybuje od 11 do 14 % obj. %. U fortifikovaných vín se alkohol přidává úmyslně [1,2,3].

Vyšší alkoholy, aldehydy a ketony vznikají jako meziprodukty při etanolovém kvašení. Acetaldehyd, aceton, metanol ve zcela zdravotně neškodném množství, glycerol. Polyalkoholy vytváří spolu s aminokyselinami aromatické estery a vznikají za pomoci bakterií a kvasinek. Metanol vzniká odbouráváním pektinů a jeho množství se zvyšuje jen intenzivním nakvácením rmutu při výrobě červených vín [4,5,6].

1.1.2 Aromatické látky

Aromatické látky vznikají látkovou výměnou při zrání hroznů. Jedná se většinou o heterogenní směsi těkavých organických sloučenin. Pozitivně i negativně ovlivňují vůni a aroma vína. Lze je rozdělit na:

- primární, vznikají v hroznech v průběhu zrání (tioly, terpeny, pyraziny a jiné),
- sekundární, vznikají v průběhu technologických procesů enzymatickými, tepelnými a mikrobiálními zásahy (tioly, estery, acetaly, těkavé fenoly a další),
- terciární, vznikají ležením a zráním vína [2].

Pro lepší porozumění jsou aromatické látky alkoholy (metanol, etanol, vyšší alkoholy), karboxylové sloučeniny (acetaldehyd), estery (nejvýznamnější buketní látky vín), těkavé kyseliny (kyselina octová), terpenoidy, norisoprenoidy, methoxypyraziny, těkavé fenoly, vonné tioly a další [1].

1.1.3 Těkavé kyseliny

Těkavé kyseliny jako kyselinu octovou můžou produkovat kvasinky či bakterie mléčného kvašení v průběhu alkoholové či jablečno-mléčné fermentace. Vyšší koncentrace kyseliny octové může vznikat také oxidací etanolu na nahnílych hroznech za pomoci octových bakterií a je zcela nežádoucí. Obsah těkavých kyselin je dle nařízení Komise (ES) č. 606/2009 vyjádřen v miliekvivalentech nebo v gramech kyseliny octové:

- 18 meq/l (1,1 g/l) pro částečně zkvašený hroznový mošt, bílé víno, nebo rosé,
- 20 meq/l (1,2 g/l) pro červené víno,

- 30 meq/l (1,8 g/l) pro výběr z bobulí, ledové víno,
- 35 meq/l (2,1 g/l) pro výběr z ciběb, slámové víno [1,7].

1.1.4 Oxid siřičitý

Jedná se o aditivum sloužící především jako antioxidační a antimikrobní činidlo, které pomáhá stabilizovat víno. V dnešní době je moderní omezení tohoto aditiva na minimum, kvůli dráždivě štiplavému zápachu jeho těkavé formy. Víno obsahující vyšší koncentraci oxidu SO₂ než 10 mg/l, musí být náležitě označeno vinařem na etiketě lahve [1,2,8].

Lze rozlišit a stanovit tři formy oxidu siřičitého:

- vázaný, reaguje s ostatními substancemi ve víně, vyskytuje se poté v různých formách (siřičitany, sulfonáty, atd.),
- volný, tedy metabolickými procesy nespotřebovaný SO₂, pouze malá část,
- celkový, jedná se o volný i vázaný SO₂ [7].

1.2 Netěkavé složky

Látky obsažené ve víně, které se nedají oddělit varem. Zvyšují plnost a zlepšují harmonii a dochuť vína [1].

Tab. 2: Obsah některých netěkavých extraktivních látek ve víně [1]

| Netěkavé složky | (g/l) |
|----------------------|-----------|
| Popel | 1,3–4 |
| Sacharidy | 1–300 |
| Glycerol | 5–25 |
| Netěkavé kyseliny | 4–12 |
| Třísloviny a barviva | 0,1–4,0 |
| Dusíkaté látky | 0,3–4,0 |
| Vitaminy | 0,01–0,05 |

1.2.1 Sacharidy

Glukóza a fruktóza udávají vínu sladkou chuť, ale také napomáhají vnímání vyšší viskozity vína a jeho plné chuti. Vznikají asimilací. Kvůli nepřesným výsledkům už se nadále nestavují jako takzvané redukující cukry, ale jako součet po enzymatické analýze každého z nich zvlášť. Sacharóza se do vína přidávat nesmí, pouze pokud nejde o výrobu šumivých vín, kde je nutné docílit sekundární fermentace. Sacharidy nacházející se ve víně ve větším množství i po fermentaci jsou pěti uhlíkaté cukry, a to arabinóza, xylóza a rhamnóza [1,2,4,6].

1.2.2 Glycerol

Glycerol se tvoří na počátku alkoholové fermentace a je důležitý pro vnímání vyšší viskozity a plnosti vín. Vyšší obsah lze nalézt zejména u botrytických vín [1].

1.2.3 Netěkavé kyseliny

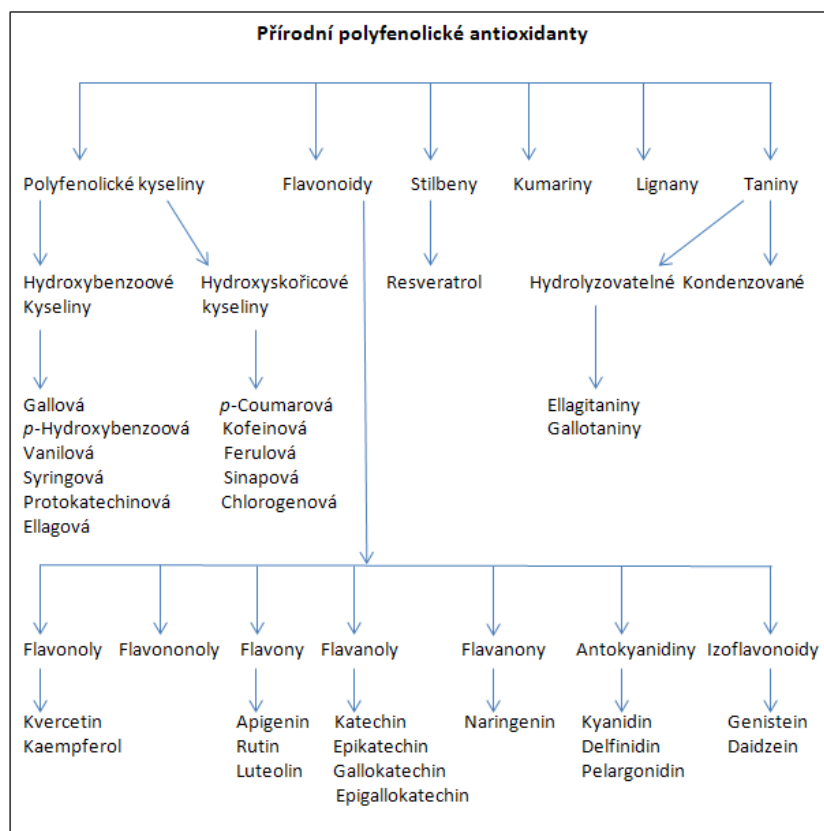
Velmi významnými netěkavými kyselinami ve víně jsou kyselina vinná a kyselina jablečná, v menším množství kyselina citronová a další organické kyseliny, které pochází přímo z hroznů. V průběhu zpracování se vytváří i další kyseliny, jako kyselina mléčná, jantarová, pyrohroznová, ketoglutarová, glukonová, slizová a jiné [1].

1.2.4 Minerální látky

Minerální látky ve víně pochází z hroznů, či jako některé povolené aditiva. Nejvíce jsou zastoupeny draslík, vápník, hořčík, sodík a další. Rozmanitost minerálních látek závisí především na složení půdy, ale také na zařízeních používaných během výrobního procesu jako jsou čištění nebo filtrace. Koncentrace stopových prvků ve víně závisí také na geografickém původu. Nejčastěji se můžeme setkat s draslíkem, vápníkem (ten se může zvyšovat v průběhu procesu odkyselování). Meďnaté ionty asociující s rozpuštěnými proteiny a vyšší koncentrace železa mohou způsobovat zakalení vína nebo i kovově hořkou chuť. Důležitým prvkem je také síra a její sloučeniny, které jsou antioxidačním a antimikrobním aditivem [1,2,8,9].

1.2.5 Polyfenolické látky

Polyfenolické látky zpravidla řadíme do široké skupiny antioxidantů. Mají fungicidní, bakteriocidní i virocidní účinnost a jsou vytvářeny rostlinami jako sekundární metabolity a slouží jako přirozená ochrana. Jsou odpovědné za barvu, tříslovitou chuť a antioxidační vlastnosti vína. Patří sem flavonoidy, které se pochází především ze slupky, třepin a bobulí a také neflavonoidy, hromadící se v dužnině hroznu. Mohou být navázány na kyselinu vinnou, ale i na třísloviny nebo cukru. Vyšší zastoupení těchto látek umožňuje vinařům snižovat obsah SO₂. Mají antioxidační vlastnosti. Jsou zodpovědné za hnědnutí vína a jsou velmi důležité při zrání vína. Z hroznů se do vína dostává až okolo 25 % z původních hodnot, vlivem technologického zpracování a oxidace (část jich zůstává v matolinách). Ve víně lze nalézt stilbeny (trans-resveratrol), flavonoidy (anthokyany (flavonoly), anthokyaniny (přírodní barviva přecházející ze slupky či dužniny jako karotenoidy), taniny (třísloviny způsobující hořkou chuť jako katechiny, epikatechiny, atd.) [1,2,10,11,12,13,14].



Obr. 1: Polyfenolické antioxidanty [15]

1.2.6 Dusíkaté látky

Pocházejí z hroznů, jsou obsaženy v anorganické i organické formě v podobě aminokyselin, amonných solí, bílkovin, biogenních aminů a dalších. Slouží jako zdroj výživy pro kvasinky, ovlivňují také kvalitu vína, jelikož se díky nim tvoří aromatické látky. V průběhu fermentace se mohou tvořit biogenní aminy, které mohou vznikat fermentací z aminokyselin působením dekarboxyláz činností bakterií mléčného kvašení, či produkce enzymově katalyzovanou aminací nebo transaminací aldehydů. Mezi nejsledovanější biogenní aminy patří histamin, tyramin, tryptamin, spermin, spermidin, putrescin a kadaverin. Nejvyšší schopnost produkce biogenních aminů má rod kvasinek *Brettanomyces bruxellensis* [1,2].

1.2.7 Vitaminy

Ve víně jsou obsaženy pouze minoritně, ale jsou využívány kvasinkami. Během kvašení můžeme nalézt vyšší obsahy B-komplexu v burčáku, v čerstvých mošttech zase vitamin C, které jsou ale ze zdravotního hlediska zcela nepodstatné [1,2].

2 VÝROBA VÍNA U MALOVINAŘŮ A HODNOCENÍ VÍNA

2.1 Legislativa

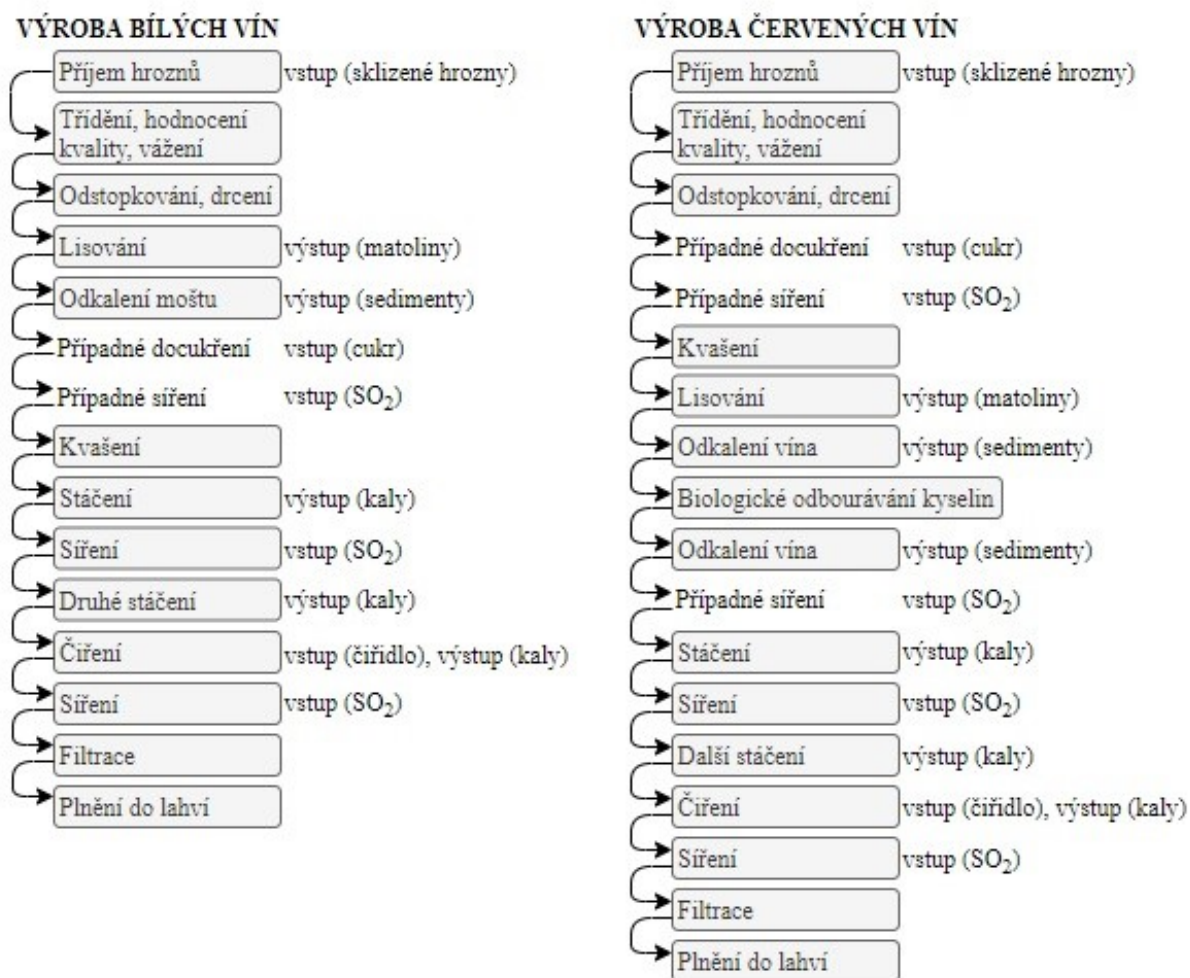
Dle zákona č. 26/2017 Sb., kterým se mění zákon č. 321/2004 Sb., o vinohradnictví a vinařství ve znění pozdějších předpisů se na malovinaře nevztahují povinnosti podle §29 zákona a nemusí vést evidenční knihy, pokud nevyrábí jakostní vína, vína originální certifikace nebo jakostní vína s přívlastkem. Dle §29 si prohlášení o sklizni nemusí podávat osoba, která veškerou svou produkci zpracovává na víno nebo si ji nechá zpracovat na víno. Malovinař, je ten, kdo pěstuje víno respektive který vlastní vinice do velikosti 10 arů vinice a nejvyšší vyrobené množství vína ze svých hroznů je dle Evropské Unie stanoveno maximálně na 1000 litrů ročně. Malovinař, který zároveň neprodává svou produkci, nemá žádné povinnosti. Vinař uvádějící do oběhu méně než 1000 litrů vína v kalendářním roce a pěstitel s plochou vinic menší než 1 ha nemá povinnost podávat výkaz o produkci vína o ploše vinic pro odvod Vinařského fondu na Ústředním kontrolním a zkušebním ústavu zemědělském (ÚKZÚZ) [16,17,18].

Velkovýrobci jsou jako provozovatelé potravinářského podniku povinni:

- mít nahlášeny a evidovány své vinice v registru vinic ÚKZÚZ,
- vést evidenční knihy dle zákona 321/2004 Sb., o vinohradnictví, vinařství a o změně některých souvisejících zákonů. Evidence by měla být vedena dle vzorů vyhlášky č. 88/2017 Sb. v platném znění. Vydavatelem vinařské evidence je také Svaz vinařů ČR,
- podávat prohlášení na ÚKZÚZ jako prohlášení o sklizni, zásobách, podávat výkaz o produkci vína a ploše vinic pro odvod Vinařského fondu,
- oznamovat zahájení, přerušení či ukončení výroby produktu, o příjmech vinařských produktů a o prodeji sudového vína na ÚKZÚK,
- oznamovat Státní zemědělské a potravinářské inspekci (SZPI) zvýšení či snížení kyselin, zvyšování cukernatosti, slazení vína, o výrobě matolinového vína pro vlastní spotřebu, hodnocení a zařizování vína dle požadavků, žádosti o povolení přiznávat vína originální certifikace (VOC), a další.

Velkovýrobci jsou také povinni řídit se nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva a také zákonem č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích [1,16,17,18].

2.2 Výroba bílého a červeného vína



Obr. 2: Diagram výroby bílých a červených vín (převzato od Balík a Stávek[1])

2.2.1 Sklizeň hroznů a jejich zpracování

Zralost hroznů může záviset na mnoha faktorech, kterými mohou být půdní podmínky, stanoviště, podnebí, ošetřování vinice i termín sklizně. Pro určení vhodné doby pro sklizeň je zapotřebí kvalitní ohodnocení kvality a zralosti hroznů, abychom docílili kvalitního vína s vynikajícím buketem. Při předčasném sběru je riziko získání průměrného a neharmonického vína s vyšším obsahem kyselin, nižším množstvím alkoholu apod. Velmi důležitou roli hraje také zdravotní stav hroznu [1,10].

Ve vinohradnictví je možno rozlišit zralost na:

- průmyslovou, která byla využívána spíše v minulosti pro dosažení co největšího výnosu (vysoký obsah cukrů),
- fyziologickou, ta je nejdůležitějším ukazatelem, určuje se většinou sensoricky (odrůdově typické zbarvení bobule a slupky, zralá semena, která by měla být hnědé barvy a schopna vyklíčit, dále měknutí, ztráta pružnosti, dobrá oddělitelnost stopek a další),
- technologickou, která je stanovena fyzikálně-chemickými metodami pro určení parametrů kvality, jako jsou cukernatost, obsah titrovatelných kyselin vinné a jablečné, hodnota pH, obsah asimilovatelného dusíku v moštu, aromatická a fenolická zralost hroznů [1,10].

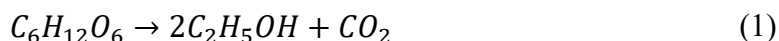
Analýzy pro určení zralosti hroznů je potřeba provádět na dostatečně reprezentativním vzorku a co nejdříve po sběru. U malovinařů nejméně 100 až 200 bobulí, které jsou v dobrém zdravotním stavu, jsou odebrány z celé plochy vinice a z obou stran listové stěny. Cukernatost hroznů se určuje v °NM (stupních normalizovaného moštoměru) moštoměrem či refraktometrem, kdy 1 °NM udává obsah cukru v kg na 100 l moštu. Určení vhodné cukernatosti hroznů je dána právními předpisy, které také určují označení vyrobeného vína. Je velmi složité určit ideální cukernatost hroznů, rozhodující je také obsah kyselin, apod. Pro tichá bílá vína při dostatečném obsahu kyselin je vhodná cukernatost od 20 do 23 °NM (u červených vín 22 až 24 °NM). Cukernatost nad 24 °NM je spojena s vyšším obsahem zbytkových cukrů ve víně či vyšším obsahem alkoholu, což má za následek vína únavná. Doporučený obsah titrovatelných kyselin u moštů pro bílá vína 6,9 až 9 g/l a pH 3 až 3,35. Obsah titrovatelných kyselin pro červená vína 5,5 až 8 g/l, pH 3,15 až 3,45. Hodnoty závisí na typu a odrůdě vína. Čím vyšší pH moštu, tím vyšší je riziko rozvíjení nežádoucích mikroorganismů. Kyselina vinná a jablečná jsou technologicky nejdůležitějšími kyselinami. Kyselina vinná se během dozrávání mění minimálně, kdežto obsah kyseliny jablečné klesá, což později způsobuje nižší svěžest vín (bílá, rosé), nadbytkem vznikají naopak tvrdá vína. Kyselinu jablečnou je nutno odbourat u červených vín, a to jablečno-mléčnou fermentací. Doporučovaný poměr u bílých vín 2:1 (vinná:jablečná), u červených 3:1. Aromatická a fenolická zralost se zaměřuje především na barvu slupky a celkové bobule a hodnotí se sensoricky [1,10,19].

Období sklizně opět závisí na podmínkách, v české republice od poloviny srpna až do konce října nebo prvních dnů v listopadu. Výjimku tvoří pouze sklizeň hroznů pro výrobu ledového vína. Zdravotní stav hroznů je velmi důležitý, je důležité dbát na šetrnou a zároveň rychlou sklizeň do prvního zasažení. Nejběžnějším problémem jsou škůdci, kteří hrozny napadají již ve vinici, jako je šedá hniloba, octové bakterie, bílé hniloby a další [1,10,19].

Nejpoužívanější metodou sklizně u malovinařů je ruční sklizeň hroznů, která probíhá do nádob o objemu 10 až 15 l a ne vyšší pro to, aby se hrozny neotlačily. Doporučený je sběr bílých odrůd za chladnějšího počasí (do 15 °C), kvůli přehřívání hroznů. U modrých odrůd by teplota neměla být vyšší než 20 °C [19].

2.2.2 Alkoholová fermentace

Alkoholové kvašení je nejdůležitějším anaerobním biochemickým procesem při výrobě vína. Při tomto procesu dochází k přeměně cukrů (glukózy a fruktózy) z hroznového moštu na alkohol (etanol) a oxid uhličitý za pomoci kvasinek za uvolňování tepla. Kvasinky mají také schopnost rozštěpit případný zbytkový, přidaný cukr sacharózu na glukózu a fruktózu a dále zpracovat na alkohol a další produkty. Zároveň dochází k odpařování a snižování hustoty a objemu vína. Zjednodušená rovnice (1) alkoholové fermentace se základními produkty:



Během kvašení se vytváří i další produkty, které vytváří sensoricky aktivní látky, které ovlivňují budoucí buket vína. Mezi primární produkty kvašení můžeme zařadit primární produkty kvašení, kterými jsou glycerol, kyselina mléčná, kyselina octová, kyselina jantarová a kyselina citronová. Jako sekundární produkty kvašení vznikají produkty jako aceton, diacetyl, vyšší alkoholy, estery, aldehydy, aromatické látky, ketony [10].

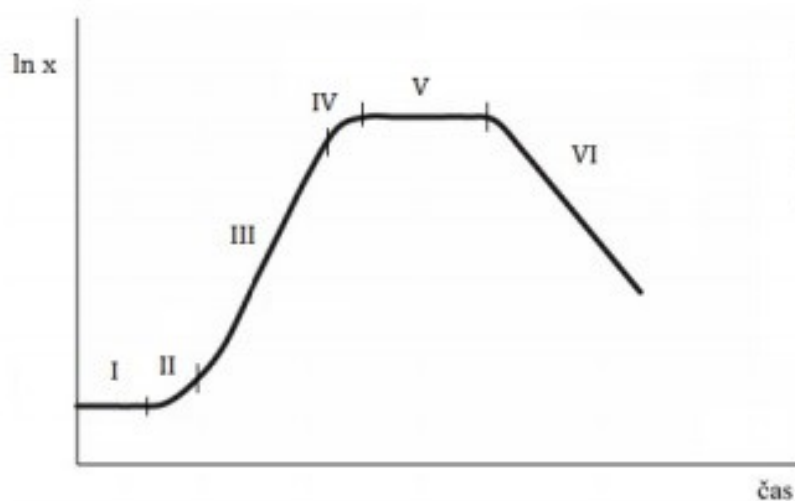
Kvasinky se běžně vyskytují v půdě vinice, na hroznech a listech révy vinné, ale také je můžeme nalézt v prostorách sklepů na zařízeních používaných během výroby vína. Divoké či apikulátní kvasinky většinou zahajují spontánní kvašení (rod *Candida*, *Klocker*, *Pichia*, a další). Ty vytváří pozitivní (glycerol) i negativní (kyselina octová) vedlejší produkty. Mezi ušlechtilé kvasinky patří kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae*, které vytváří méně nežádoucích produktů a vyšší koncentrace alkoholu. Některé kvasinky mohou způsobovat také vady či nemoci vína, jako například křísotvorné kvasinky rodu *Candida*,

Pichia či *Hansenula*. Kvasinky rodu *Brettanomyces* mohou produkovat těkavé fenoly připomínající koňský pot. Je zde riziko druhotného kvašení, které může nastat za použití kvasinek rodu *Saccharomyces*. Moderní je zakvašování čistou kulturou kvasinek. Kmeny kvasinek jsou dnes běžně dostupné na trhu a vinař si může vybrat dle teploty a stylu vína, pro své odrůdy a tím docílit vhodného charakteru vína. Pokud se vinař zaměřuje na terroir vína s půdně klimatickými faktory vinice, je zapotřebí uzpůsobit tomu i kvasinky. Jednou z možností je izolace kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* z vlastních hroznů či moštů, kterou pak aplikují namísto komerčně zakoupených kmenů a zachovávají tak autenticitu vína. Další možností způsobu kvašení je kvašení podvojně, neboli postupně. Jedná se o časově oddělené zákvasy s různými kulturami kvasinek. Nejdříve se používají sušené nesaccharomycetní kvasinky *Torulaspóra delbrueckii*, dojde ke zvýšení obsahu alkoholu a pozůstanou zbytkové cukry. Poté se přidají kultury *Saccharomyces cerevisiae*, aby došlo k celkovému prokvašení do sucha [1,10,20].

Formy použití kvasinek:

- rozkvašený mošt (dávka 2 l na 100 l moštu pro bílá vína a 2 až 4 l na 100 kg rmutu pro červená vína),
- ASVK neboli aktivní sušené vinné kvasinky, vakuově balené (dávka 20 až 40 g na hl) [1].

Fermentace probíhá v několika stádiích, která korespondují s růstovými fázemi kvasinek, viz obr. 3:



Obr. 3 Růstová křivka kvasinek [21]

- I: Lag fáze, kde dochází k přizpůsobování kvasinek a uvolňování CO₂, tato fáze je nejrizikovější a je potřeba ji zkrátit,
- II: Fáze zrychleného růstu, kde dochází k rozmnožování kvasinek, fáze je obvykle časově velmi krátká,
- III: Exponenciální fáze, nebo také fáze hlavního kvašení, dochází zde k maximálnímu nárůstu kultury, metabolismu cukru a tím pádem k maximální tvorbě etanolu,
- IV: Fáze zpomaleného růstu a stacionární fáze, zde dochází ke stejnému množství přibývajících a odumírajících kvasinek, ale rychlost kvašení zůstává stejná (čím je fáze kratší, tím rychleji fermentace proběhla), období burčáku,
- V: Fáze odumírání je fází zpomalování a následném dokvašení a zastavení kvasného procesu, nastává většinou kolem dosažení 4 % obj. alkoholu [1].

Optimální teplota kvašení u bílých vín by neměla přesahovat teplotu 25 °C, aby nedocházelo k vysokým ztrátám alkoholu a negativnímu ovlivnění aromatických látek a iniciaci jablečno-mléčné fermentace, která je u bílých vín nežádoucí. Vhodná teplota kvašení u modrých odrůd by se měla pohybovat v rozmezí od 25 do 30 °C, po vylisování by se měla teplota snížit na 20 až 25 °C. Kvašení mladého vína lze zastavit aplikací oxidu siřičitého a okamžité stočení z kvasinek, silným podchlazením s okamžitým stočením z kvasnic nebo ostrou filtrací. Pro podpoření růstu kvasinek se kvasící mošt lehce sytí kyslíkem o koncentraci 6 až 8 mg/l. Pro regulaci kvasného procesu, potlačení divokých kvasinek a zábraně množení nežádoucích mikroorganismů se mošt ošetřuje SO₂ od 20 do 50 mg/l. Odkalování moštu snižuje obsah nečistot (méně pěnění), neprovádí se však úplné odkalení z důvodu sedimentace preparátů (křemelina, celulóza) pro dobrý pohyb kvasinek a uvolňování CO₂. Nehrozí tak riziko nechtěného zastavení fermentace. Lze přidat preparáty podporující kvašení, tedy výživu kvasinek ve formě minerálních látek, asimilovatelného dusíku, vitaminů, apod [1,20,22].

U malovinařů se pro proces kvašení moštů používají nejčastěji skleněné, keramické, laminátové nádoby nebo dřevěné sudy viz kap. 2.1.6 Zrání a skladování vína. Kvašení při výrobě červených vín se provádí v otevřených nebo uzavřených nakvášecích nádobách [1,20].

2.2.3 Výroba červených vín

Druhy postupů výroby červených vín:

- fermentačně-macerační cestou,
- teplou cestou,
- karbonickou macerací a jinými předfermentačními postupy [1].

Nejrozšířenějším způsobem výroby červeného vína je především fermentačně-maceračním způsobem. Během fermentace probíhá macerace fenolických látek z bobulí a jejich slupek, odkud se uvolňují antokyany a trísloviny ze slupek (při vyšším obsahu alkoholu také ze semen). Během tohoto procesu je důležité zabránit tvorbě octění povrchu matolinového klobouku promícháváním (prováděno ručně). Je zapotřebí, aby promícháváním došlo k provzdušnění a docházelo tak k uvolňování polyfenolů. Tato fermentace probíhá až okolo 10 dnů a během této doby je potřeba hlídat, jestli víno silně neoxiduje, nedochází k počátku octění nebo sirce vína. Obsah rmutu se scedí z matolin a dochází k získání samotku. Následuje biologické odbourávání kyselin (BOK) například v sudech barrique, kde se harmonizují účinky látek ze dřeva a produktů JMF. Mimo barrique sudy je možné nechat zrát víno v dřevěných sudech při pravidelném stáčení přes vzduch. Je zapotřebí vše kontrolovat s SO₂ (koncentrace 25 až 30 mg/l) [1,23].

Lisování u výroby červených vín se provádí až po ukončení macerace rmutu, kde ze slupek bobulí dochází k vyluhování červených barviv. Proces kvašení probíhá obdobně jako u výroby bílých vín. Při výrobě červených vín je žádoucí bakteriální či biologické odbourávání kyselin (BOK), které se nazývá také jablečno-mléčné kvašení (JMK) nebo malilaktická fermentace (JMF), která je enzymatickou přeměnou kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou, CO₂ a dalších látek za pomoci mléčných bakterií. Cílem JMK je minimalizovat kyselinu jablečnou a přeměnit ji na kyselinu mléčnou, která je harmonicky jemnější a vyváženější, což je žádoucí u červených vín. K JMK může docházet stejně jako u alkoholové fermentace spontánně, což je nežádoucí a hrozí k tvorbě negativních sensorických látek (těkavých kyselin, sirnatých látek, atd.). Po JMK je obsah kyseliny mléčné ve vínech od 0,5 do 3 g/l, vznikají však také vedlejší produkty (kyselina octová, acetoin, diacetyl, a jiné). Při vyšším pH nad 3,5 může během JMK docházet k množení mikroorganismů, které mohou znehodnotit produkt jako například *Pediococcus damnosus*, který produkuje diacetyl tvořící sliz a to může vést k vláčkovatění vína [1,23].

Mléčné bakterie lze rozdělit na dva druhy:

- homofermentativní, přeměňují glukózu a fruktózu na kyselinu mléčnou (*Pediococcus*),
- heterofermentativní, kromě kyseliny mléčné vytváří navíc ještě další produkty, jako kyselinu octovou, etanol, CO₂ a další (*Lactobacillus*, *Oenococcus oeni*).

Bakterie se do vína dostávají z hroznů a z obalů (hadice, ventily apod.). Další možností je současné využití lyofilizovaných čistých kultur komerčních kmenů. Inokulaci je vhodné provádět před začátkem alkoholového kvašení, nebo po jeho ukončení (častěji a s přirozenou mikroflórou). Podmínkou pro růst těchto bakterií a zároveň docílit odbourání kyseliny jablečné je zapotřebí mít alkohol do 13,5 %, zabránit volnému SO₂, celkový SO₂ mít do 30 mg/l, pH nad 3,1, konstantní teplotu mít v rozmezí 19 až 22 °C a mít přítomný kvasničný kal jako zdroj výživy mléčných mikroorganismů a jako ochranu před oxidací. Ukončení BOK se provádí zjištěním obsahu kyseliny jablečné, která by měla být v rozmezí 0 až 0,2 g/l (to znamená, že se obsah titrovatelných kyselin nemění). Víno se poté stáčí z kalů a ošetřuje SO₂ (30 až 40 mg), poté se zchlazuje pod 15 °C [1,19,23].

2.2.4 Odkyselování

Při nepříznivých podmínkách v severních vinohradnických oblastech dochází přirozeně ke zvyšování kyselosti hroznů, kterou jsou pak vinaři nuceni snižovat.

Způsoby odkyselování vína:

- přirozeně,
- uhličitanem vápenatým (jednoduše, podvojně),
- hydrogenuhličitanem draselným [1].

2.2.5 Školení vína

Číření vína je operace, pro odstranění nebo snížení obsahu nežádoucích látek ve víně, získání vhodných organoleptických vlastností a získání stability vína. Víno lze čířit několika způsoby:

- fyzikálně, a to sedimentací hrubých a jemných částic ve víně na dno nádoby, provzdušněním (nebezpečí oxidace),
- chemicky, tedy čířícími prostředky [1,19].

Druhy čířidel:

- bentonit,
- křemičitany,
- želatina,
- vyzina,
- vaječný bílek,
- kasein a PVPP,
- a další.

Čířící prostředky pro bílá vína jsou zejména kasein, pro červená vína mléko nebo bentonit.

Filtrace:

- křemelinová,
- membránová.
- s použitím filtračních desek a deskových filtrů [1,19].

Scelování, slazení a přikyselování jsou dalšími z operací, které se během školení vína provádí. Scelování vín je jejich kupážování či blending, díky kterému mohou vznikat vynikající vína typu cuvée a patří mezi vinařská umění, jelikož vyžaduje řadu zkušeností s citem pro sensorické posouzení organoleptických vlastností. Slazení a přikyselování se provádí opět sensoricky, avšak slazení je povoleno pouze pomocí hroznového moštu, zahuštěného hroznového moštu nebo rektifikovaného moštového koncentrátu a celkový obsah alkoholu nesmí být zvýšen o více, než 4 % obj. Přívlastková vína je zakázáno doslazovat jakýmkoliv způsobem. Přikyselování vína přísadkou jakékoliv kyseliny je v našich oblastech zakázáno [1,7].

2.2.6 Zrání a skladování vína

Zrání a skladování vína probíhá nejčastěji v dřevěných sudech (především u červených vín). Sudy jsou nejčastěji vyráběny z dubového dřeva, které je stabilní, ale také pozitivně ovlivňuje chuť vína, především taninů. Sudy se konzervují plynným oxidem siřičitým, který je znám především ve formě sirných knotů (plátků), ale moderně také vstřikováním plynné síry. Sudy je vhodné ošetřovat pomocí oxidu siřičitého jednou za měsíc. Víno lze nechat zrát v sudech barrique. Dle vyhlášky č. 88/2017 Sb. ve znění pozdějších předpisů je uvedeno, že víno, které zrállo nejméně šest měsíců v dubovém sudu větším než 210 litrů a menším než 250 litrů, lze označit slovem barrique. Zajímavostí je, že se tento termín pro

výrobu a možnost označení na etiketách nachází pouze v legislativě na území České republiky a Slovenska. Jako náhrada dubových sudů se využívá také dubových chipsů nejrůznějších materiálů a velikostí. Cílem chipsů je lepší struktura vína a přidávají se až po ukončení kvašení. Dalším typem nádob (nádrží) sloužících pro zrání vína jsou nádrže z nerezavějící oceli, které jsou pokryty vrstvou ze slitiny nejčastěji chromu, ale i niklu, molybdenu, či titanu. Tento typ nádrží má nevýhodu v ekonomické nevýhodnosti a pomalému zrání vína, ale je snadno čistitelný, skladný a lze jej vyrobit na míru. Vyrábějí se také dvouplášťové typy, které jsou vhodné pro lepší regulaci teploty. Malovinaři většinou používají skleněné nádoby, tzv. demižony, které jsou vyráběny v objemech od 3 do 50 litrů a mohou být oplétány ocelovým košem (nyní spíše košem plastovým). Nejvhodnější z nich jsou nádoby se šroubovacím plastovým uzávěrem, kde nedochází k průniku kyslíku. Méně využívané jsou plastové nádoby (sklolaminát, PET), kvůli vinnému kameni, který se zde lépe drží. Keramické nádoby jsou nejstarším materiálem pro skladování a zrání vín. Tato metoda byla využívána v nádobách zvaných amfory vyrobených z hlíny, se zráním rmutu uvnitř hluboko v zemi. Později a i v dnešní době jsou využívány nádoby keramické (glazované). Mezi naturálními vinaři v České republice, ale i jinde v zahraničí je nyní trendem výroba katechského (katechinského) způsobu výroby vína. Tento způsob pochází z Gruzie, kde se víno vyrábí v nádobách zvaných kvevri, které byly vyvinuty z klasických amfor. Vína zrají na slupkách a vznikají bez jakéhokoliv chemického zásahu. Vlivem delší macerace vykazují vyšší obsah polyfenolických látek (až 2000 mg/kg, oproti běžných 300 mg/kg u bílých vín). Mají díky tomu také sytější, oranžovou barvu, u nás jsou tak také označovány jako vína oranžová [1,19,24].

Lahvování a uzávěry:

- šroubovací,
- plastové,
- skleněné,
- korkové [1].

2.3 Hodnocení vína

Jakost vína se zpravidla hodnotí klasickými chemickými, instrumentálními a senzorickými metodami. Mezi tyto patří obecně stanovení cukernatosti moštu, alkoholu ve víně, cukru ve

víně, stanovení kyselosti, konzervačních látek (SO_2 a kyselina sorbová), minerálních látek, bílkovin ve víně a další. Často je prováděna také analýza mikrobiologická.

2.3.1 Senzorické hodnocení

Senzorickým hodnocením vína rozumíme hodnocení pomocí lidských smyslů, kterými jsou zrak, čich a chuť, ale i negativní projevy. Zrakem je hodnocena barva, tón a čistota vína, kterou posuzujeme naproti světlu. Sklenice by se měla držet šikmo a pozorovat shora nad bílým pozadím [25]. Teplota vína je pro toto hodnocení vína velmi důležitá, u bílých a růžových vín je vhodná teplota od 10 do 12 °C, u červených vín teplota spíše pokojová, pro déle zrající však ideálně 18 až 20 °C, pro krátce zrající či průměrná pak 15 až 16 °C [26]. Čichem bývá hodnocen buket vín, kterým analyzujeme vůně primární, sekundární a terciární, vůně dané aromatickými látkami viz kap. 1.1.2. Chuť má na hodnocení vína vliv největší a víno se ochutnává tak, že se hodnotitel napije malého doušku vína, který nechá převálovat od špičky jazyka až po jeho kořen, aby víno přišlo do styku se všemi chuťovými pohárky. Také se hodnotí perzistence, dochuť a tělo vína a tím jestli je víno např. krátké, prázdné či plné [26,27,28].

Mezi nejpoužívanější metody sensorického hodnocení vín dle ČSN ISO patří zkoušky rozdílové, mezi které se řadí:

- párová porovnávací zkouška,
- zkouška duo-trio,
- trojúhelníková zkouška,
- zkoušky s více jak třemi vzorky (tetrádová zkouška),
- zkouška „A“ – ne „A“,

dalšími zkouškami jsou zkouška pořadová, pomocí stupnic a profilů (nejčastěji je víno hodnoceno pomocí bodovacího systému stobodové, dvacetibodové stupnice) a některé další metody sensorického hodnocení [2,29,30,31].

2.3.2 Analytické hodnocení vína

Toto hodnocení slouží pro základní, ale i rozšiřující informace o víně pro výrobce i spotřebitele. Nejčastěji se používá následující stanovení:

- stanovení obsahu alkoholu ebulioskopicky (Mallinganovým přístrojem), princip spočívá v rozdílném bodu varu alkoholu a vody,

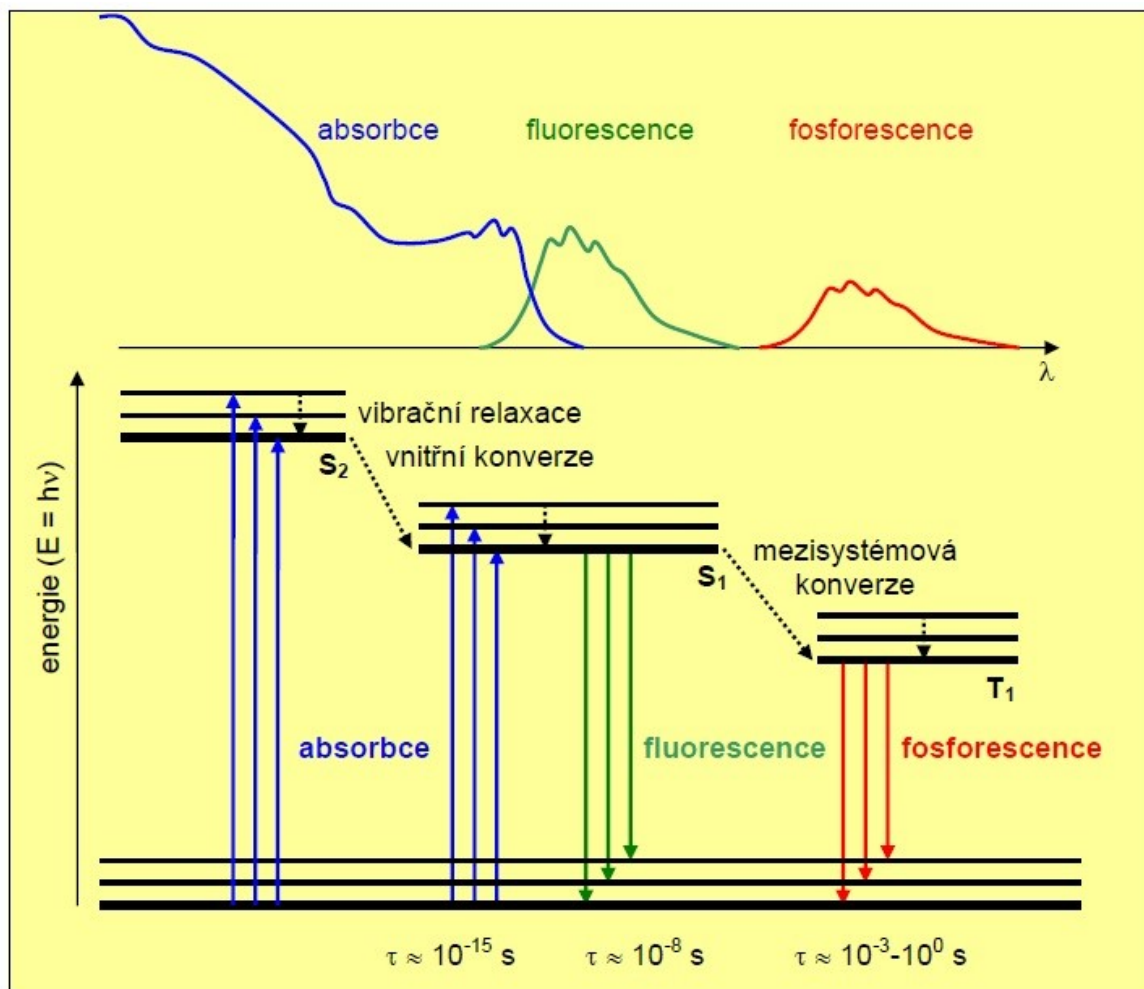
- stanovení alkoholu destilací,
- stanovení obsahu alkoholu pyknometricky,
- stanovení hustoty vína pyknometricky viz kap. 6.5.3,
- stanovení celkových titrovatelných kyselin (acidobazické titrace),
- stanovení těkavých kyselin,
- stanovení netěkavých kyselin,
- enzymatické stanovení glukózy a fruktózy,
- stanovení redukujících cukrů dle Rebeleina,
- stanovení extraktu,
- stanovení SO₂ destilací a titrací,
- stanovení SO₂ odměrným roztokem jódu,
- testy bílkovinových stabilit vína
- testy přítomnosti sulfanu ve víně (páchnoucí tioly)
- testy krystalické stability vína,
- stanovení zákalu vína nefelometricky,
- stanovení polyfenolických kyselin pomocí HPLC viz kapitola 6.4.3,
- stanovení organických kyselin pomocí HPLC,
- stanovení minerálních látek,
- stanovení chromatických (trichromatických charakteristik),
- spektrofotometrický stanovení v UV/VIS a IR viz kap. 6.5.1,
- a další [1,31,32].

3 FLUORESCENČNÍ SPEKTROMETRIE

3.1 Fluorescenční spektroskopie

Elektromagnetický jev fluorescence je třístupňový proces, ke kterému dochází v určitých případech molekuly zvané fluorescenční barviva fluoroforů. Fluorofor je excitován do elektronového singletového stavu pomocí absorpce externího fotonu. Excitovaný stav podstupuje konformační změny a interakce s molekulárním prostředím mnoha různými způsoby, včetně vibrační relaxace, kalení a energie. Foton je emitován na delší vlnové délce, zatímco fluorofor se vrací do svého základního stavu. Rozdíl v energii nebo vlnové délce mezi absorbovaným a emitovaným fotonem se nazývá Stokesův posun. Fluorescenční excitace a emise světla se obvykle objevuje během nanosekund a nezávisí na teplotě. Pomalejším a podobným jevem je luminiscence je fosforescence, kde foton prochází mezilehlým excitovaným tripletem, kde dosvit trvá déle než mikrosekundy a která je závislá na teplotě. Rozhodující je molekulární teplota a prostředí, zda je sloučenina fluorescenční. Fluorescence často vykazují organické sloučeniny se stabilní molekulovou stavební hmotností, obvykle polyaromatické uhlovodíky a heterocykly. Fluorescence je jedinečná mezi ostatními spektroskopickými technikami, protože je neodmyslitelně multidimenzionální. Fluorofor potřebuje specifickou úroveň energie, která má být excitována, a následující emisní energie odpovídá rozdílu mezi excitovanými a základními singletovými stavy. Každý elektronický stav má několik souvisejících úrovní vibrací, což znamená, že k excitaci nedochází jen u jedné vlnové délky, ale spíše přes distribuci vlnových délek odpovídajících několika vibračním přechodům [33].

Dosvit fluorescence je velmi krátký a odeznívá ihned po ukončení excitace. Průměrný čas od excitace po návrat elektronu do základního stavu lze nazvat jako doba života fluorescence. Pohybuje se v nanosekundách [34].



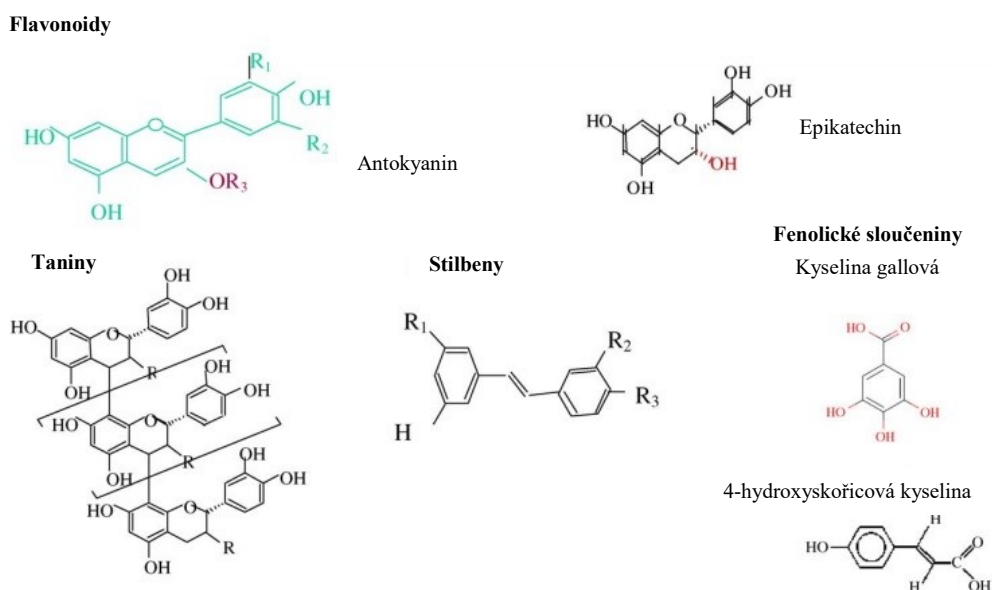
Obr. 4: Jablonského diagram – schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly [35]

Fluorescencí tedy rozumíme spinově dovolený zářivý přechod, který přechází obvykle z rovnovážné vibrační hladiny stavu S_1 do některé z vibračních hladin stavu S_0 . Fosforescencí je pak zářivý přechod z energeticky vyššího do nižšího stavu mající rozdílnou multiplicitu T_1 do S_0 . Zpožděnou fluorescencí můžeme popsat zářivý přechod téhož singletového stavu S_1 stejně jak u fluorescence s rozdílem delší doby dohasínání, která je dána časem, po který se molekula nachází v tripletovém stavu. Také platí pravidlo, že doba zpožděné fluorescence je rovna době dohasínání fosforescence měřené za stejných podmínek a spektrum emisní zpožděné fluorescence je stejné jako emisní spektrum fluorescence okamžité [35].

Rychlá fluorescenční měření lze aplikovat přímo na vína pro monitorování odrůd vín. Fluorescenční spektroskopie společně s chemometrií nabízí přístup k ověřování pravosti vín. Tato technika je nedestruktivní, rychlá, snadná a není drahá [36].

3.2 Využití fluorescenční spektrometrie

Fluorescenční spektroskopie je v oblasti stanovení kvalitativních parametrů zajímavou senzorickou technologií, protože fluorescenční látky nacházíme v potravinách a nápojích v podobě proteinů, vitaminů, sekundárních metabolitů, pigmentů, toxinů, aromatických sloučenin a dalších. Je široce používána v biologických vědách díky její vysoké citlivosti a specifitě. Fluorescenční spektroskopie nabízí velké množství výhod pro charakterizaci molekulárních reakcí a interakcí. Je 100 až 1000 krát citlivější než jiné spektrofotometrické techniky. Fluorescenční techniky jsou velmi citlivé pro okolí, například tryptofanové zbytky ukryté v hydrofobním zbytku mají odlišné fluorescenční vlastnosti než zbytky na hydrofilním povrchu. Díky této citlivosti je umožněno charakterizovat konformační změny tepelné, rozpouštědlové nebo povrchové denaturace. Fluorescenční metody jsou také relativně rychlé. Fluorescenční spektra poskytují informace týkající se molekuly obsahující konjugované dvojně vazby. Fenolové kyseliny, stilbeny, antokyany, flavanoly a taniny jsou nejnámějšími fluorescenčními molekulami ve vínech, viz obr. 6. Typy a části těchto molekul se mění jako funkce zralosti hroznů. Zpracování a zrání vína má také vliv na fenolové sloučeniny. Víno obsahuje také více sloučenin, které mohou fluoreskovat, například proteiny. Takže například spektrum zaznamenávané na vzorku vína při excitaci 261 nm obsahovalo informace o několika fluoroforech a může být považován za charakteristický otisk prstu, který může vést k identifikaci vzorku [33,34,35,36].

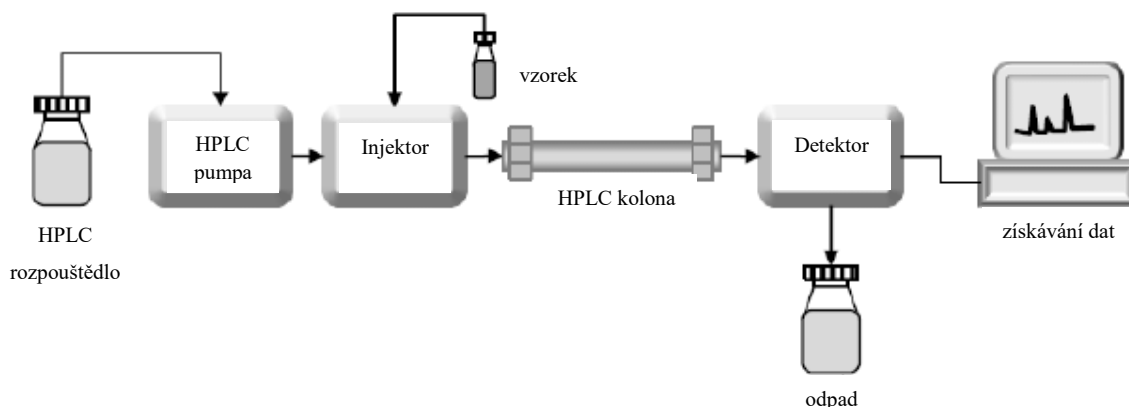


Obr. 5: Chemická struktura některých polyfenolů obsažených ve vínech [36]

4 VYBRANÉ METODY ANALÝZY TICHÝCH VÍN

4.1 Metoda HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je analytickou separační metodou. Stacionární fáze je umístěna na pevném nosiči uvnitř chromatografické kolony. Nosičem je nejčastěji křemenná či zirkonová kulička. Nejčastěji se používá oktadecylový zbytek a částečně i oktylový. Mobilní fází může být pufr, metanol, redestilovaná voda, kyselina mravenčí, a jiné. Eluce vzorku kolony může být buď izokratická nebo gradientová. Izokratická znamená, že se po celou dobu analýzy složek v koloně mobilní fáze nemění. Naopak u gradientové se poměry a složení mobilních fází při analýze mění. Doba analýzy závisí na druhu vzorku. Pro stanovení látek, jako jsou vitaminy či polyfenolické látky se používá nejčastěji detektor UV, který absorbuje záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Pro nepřerušované chromatografické separace se používají detektory diodového pole (DAD) [37].



Obr. 6: Schématický diagram vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)[38]

4.2 Spektrofotometrie UV/VIS

Spektrofotometrie se řadí mezi kvalitativní spektrální metody. Při měření se s vlnovou délkou se mění absorbance vzorku a závisí na absorbujících částicích v dráze paprsku, kterou daný paprsek prochází (tloušťka vrstvy). Tento vztah vychází z Lambert-Beerova zákona [37,38,39]:

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot b \cdot c \quad (2)$$

kde A je absorbance roztoku látky při určité vlnové délce λ ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, ϵ_λ značí molární absorpční koeficient látky při určité vlnové délce λ , b je tloušťka vrstvy (cm) a c je látková koncentrace látky v roztoku v (mol/l). Absorbance je bezrozměrnou veličinou, která je lineárně závislá na látkové koncentraci absorbující látky. Transmittance pak vyjadřuje frakci světla, které je pohlceno v kyvetě poměrem intenzity světla, které vstupuje do kyvety I_0 a intenzity světla, které z ní vystupuje I , což vysvětluje vztah uvedený v rovnici [37,38,39]:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (3)$$

Závislost absorbance (transmittance) při konstantní koncentraci látky a tloušťce vrstvy udává absorpční spektrum látky. Při analýze pomocí spektrofotometrie se vychází z přípravy standardního roztoku, jehož naředěním vzniká řada kalibračních roztoků a vytvoří se kalibrační graf. Pro výše uvedené vztahy platí, že absorbance je záporně vzatý logaritmus transmittance [37,38,39]:

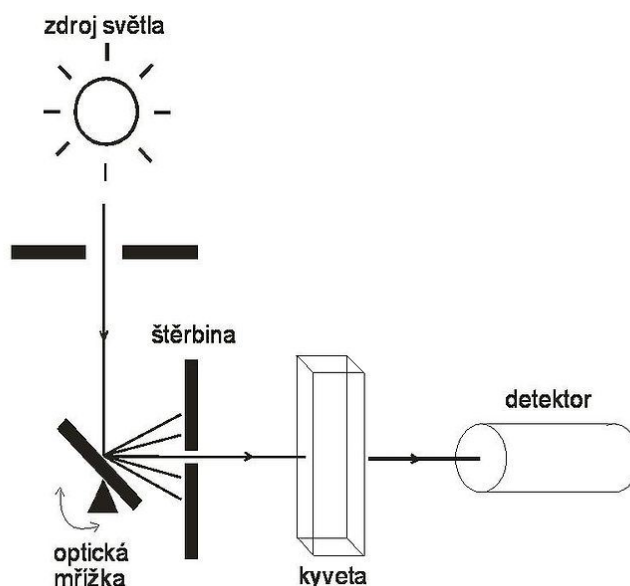
$$A = -\log T = \log \frac{I}{I_0} \quad (4)$$

Spektrofotometr je tedy přístroj, který měří množství fotonů (intenzity světla) absorbovaných po průchodu roztokem vzorku. Pomocí spektrofotometru lze určit množství známé chemické látky (koncentrace) měřením intenzity detekovaného světla. V závislosti na rozsahu vlnové délky může být klasifikován do dvou různých typů:

- UV-viditelný spektrofotometr: používá světlo přes ultrafialové spektrum (185 - 400 nm) a viditelný rozsah (400 - 700 nm) spektra elektromagnetického záření,
- IR spektrofotometr: používá světlo přes infračervené pásmo (700 - 15000 nm) spektra elektromagnetického záření [40].

Je složen ze zdroje záření, monochromatoru (optické mřížky), kyvety, detektoru a vzorku. Monochromator se používá k rozdělení vstupujícího záření a prochází ním polychromatické světlo. Pevně nastavená štěrbina určuje rozsah vlnových délek vycházejících z monochromatoru. Také je složen z disperzního prvku (hranolu či mřížky) a výstupní štěrbiny. Měření pak probíhá ve skleněných nebo křemenných kyvetách. Pro oblast vidi-

telného spektra záření se používají spíše kyvety křemenné. Světlo vycházející ze vzorku dopadá na detektor, nejpoužívanějším z detektorů je fotonásobič. Dále to mohou být diodová pole, polovodiče atd. Standartní kyvety jsou o optické dráze dlouhé 1 cm a umísťují se do kyvetového prostoru. Některé spektrofotometry umožňují vložit do kyvetového prostoru více kyvet najednou [40].



Obr. 7: Schéma uspořádání spektrofotometru[40]

4.3 Stanovení polyfenolických látek s čínidlem Folin-Ciocalteu

Tato spektrofotometrická metoda je založena na měření absorbance vzorku s následným zjištěním koncentrace celkových polyfenolů. Jedná se o běžně používanou metodu stanovení polyfenolů za pomoci Folin-Ciocalteuova činidla, avšak velmi často modifikovanou. Folin-Ciocalteuovo činidlo je tvořeno ze směsi kyseliny fosforečno-wolframové ($H_3PW_{12}O_{40}$) a kyseliny fosforečno-molybdenové ($H_3PMo_{12}O_{40}$) a je schopno oxidovat monofenoly i polyfenoly v alkalickém prostředí. Touto reakcí tak dochází k oxidaci fenolických látek ze žluté barvy na modrou. Toto modré zbarvení silně absorbuje v oblasti $\lambda=765$ nm a je úměrné k množství původně přítomných fenolových sloučenin. Modré pigmenty pak mají maximální absorpci v závislosti na složení fenolových směsí a pH roztoku, které se upravuje přidáním uhličitanu sodného. Voda, jako rozpouštědlo je zde velmi zásadní a použitím jiného rozpouštědla hrozí negativní dopad na vznik modrého pigmentu. Standardem je nejčastěji kyselina gallová, čímž je obsah polyfenolů vyjádřen v ekvivalentech mg kyseliny gallové na 1 kg vzorku [2,37,41].

Analýzy typu Folin-Ciocalteu (FC) jsou pohodlné, jednoduché a vyžadují pouze běžné vybavení a vytvořily velké množství srovnatelných dat. Za správných podmínek zahrnuje test monofenoly a poskytuje předvídatelné reakce s typy fenolů vyskytujících se v přírodě. Protože různé fenoly reagují v různých stupních, vyjádření výsledků jako jediné číslo - například miligramů na literární ekvivalent kyseliny gallové - je nutně libovolné. Vzhledem k tomu, že reakce je nezávislá, kvantitativní a předvídatelná, může být analýza směsi fenolů přepočtena podle jiných standardů. Test měří všechny sloučeniny snadno oxidovatelné za reakčních podmínek a jeho velmi inkluzivnost umožňuje, aby určité látky také reagovaly, které buď nejsou fenoly, nebo jen málokdy jsou považovány za fenoly (např. proteiny). Rozumné použití testu - s ohledem na potenciální interference v konkrétních vzorcích a v případě potřeby předchozí studie - může vést k velmi informativním výsledkům. Agregovaná analýza tohoto typu je důležitým doplňkem a často informativnějším než reemý údajů, které je obtížné shrnout z různých technik, jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), která odděluje velký počet jednotlivých sloučenin. Směs umožňuje stanovit jeden reaktant jinými prostředky a vypočítat jeho podíl na celkovém obsahu fenolu. Relativní necitlivost FC analýzy na mnoho adsorbentů a precipitantů dělá diferenciální test - před a po několika různých léčbách – informativní [32,42,43].

Vzhledem k tomu, že měří anti-oxidační kapacitu in vitro, bylo činidlo použito k testování potravin a doplňků v potravinářství [43,44].

5 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo zpřehlednit chemické složení vína, charakterizovat výrobu vína u malovinařů, popsat principy fluorescenční spektroskopie a některé další vybrané metody. Následně bylo úkolem analyzovat a hodnotit vzorky tichých vín z různých vinařských oblastí metodami fluorescenční analýzy a doplnit je o analýzu vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení polyfenolických látek a antokyaninů. Pro obohacení bylo vhodné metody porovnat s dalšími metodami, jako jsou spektrometrické stanovení UV/VIS, stanovení polyfenolických látek metodou dle Folin-Ciocalteua a hustoty pyknometricky.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 METODIKA

6.1 Chemikálie a pomůcky

Pro jednotlivá stanovení byly použity tyto chemikálie:

- kyselina chromsírová, Ing. Petr Švec, Penta, ČR,
- etanol, Ing. Petr Švec, Penta, ČR
- dietyléter, Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR
- kyselina gallová, Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR,
- činidlo Folin-Ciocalteu, Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR,
- 20% uhličitan sodný (Na_2CO_3), Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR,
- mobilní fáze A: 99/1: redestilovaná voda/kyselina octová ledová (99,8%), Ing. Petr Švec, Penta, ČR
- mobilní fáze B: 67/32/1: redestilovaná voda/acetonitril/kyselina octová ledová (99,8%), Ing. Petr Švec, Penta, ČR
- kyselina gallová, Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR,
- destilovaná voda (laboratoř FT UTB vlastní destilační aparaturou)
- metanol, Ing. Petr Švec, Penta, ČR.

Pro analýzy bylo použito běžně užívané laboratorní sklo a dále tato zařízení a přístroje:

- pyknometr 25 ml,
- analytické váhy (Schoeller AFA-2102C, ČR)
- spektrofluorimetr RF-1501 CE včetně xenonové lampy pro měření v UV oblasti spektra od 220 do 360 nm (Shimadzu, Japonsko), kyveta pro spektrofluorimetr s optickou délkou 1 cm,
- spektrofotometr Cecil 1021, UV/VIS (Velká Británie),
- spektrofotometr Lambda 25, UV/VIS (Perkin Elmer, USA)
- chromatograf UHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, MA, USA) s detektorem DAD, UV/VIS a autosamplerem,
- kolona Phenomenex Kinetex C18 (150 x 4,6 mm; 5 μm),
- program ChameleonTM 7.2 Chromatography Data System (Thermo Scientifics, MA, USA),
- program Sigma Plot 8.0, 2002 (SPSS Inc., USA).

6.2 Charakteristika vzorků

Pro analýzu vína byly použity vzorky dodané od malovinařů (některé zakoupené v obchodní síti), a to z České Republiky, Slovenska a Rakouska. Z bílých tichých jakostních vín byly vybrány a použity odrůdy Ryzlinku vlašského, Veltlínského zeleného a z červených vín odrůda Merlot. VZ a RV z České republiky byly dodány od malovinaře Josefa Šťastného z Petrova. Merlot ze stejné oblasti a podoblasti, ale jiné obce byl komerčně zakoupen z vinařství Víno Blatel, a.s. Vzorky ze Slovenska byly dodány od dvou malovinařů ze Skalice. Vzorek VZ dodal pan Petr Zelenka, RV a Merlot pan Peter Machlica. Vzorek rakouského vína Grüner Veltliner byl poskytnut prostřednictvím Kateřiny Svatoňové z vinotéky Vinoportugal ve Zlíně, vzorek pochází z vinařství Hebenstreit. Rakouský vzorek Welschriesling byl komerčně zakoupen v rakouském obchodním řetězci ve Vídni.

Tab. 3: Tichá vína z ČR, SK a Rakouska (sestupně)[45,46,47]

| Odrůda vína | Oblast a podoblast | Obec a viniční trať | Druh | Ročník | Vinař/vinařství |
|-------------------|--------------------|--------------------------------|---------|--------|---------------------|
| Veltlínské zelené | Morava, Slovácká | Petrov, Veselé | Bílé | 2017 | Josef Šťastný |
| Ryzlink vlašský | Morava, Slovácká | Petrov, Veselé | Bílé | 2017 | Josef Šťastný |
| Merlot | Morava, Slovácká | Uherský Os- troh Plachty | Červené | 2015 | Víno Blatel, a.s. |
| Veltlínské zelené | Malokarpatská | Skalica, Kraví hory | Bílé | 2017 | Peter Zelenka |
| Ryzlink vlašský | Malokarpatská | Skalica, Propaste | Bílé | 2017 | Peter Machlica |
| Merlot | Malokarpatská | Skalica, Propaste | Červené | 2017 | Peter Machlica |
| Grüner Veltliner | Weinviertel | Kleinriedenthal Retz | Bílé | 2017 | Hebenstreit |
| Welschriesling | Steiermark | Klöch, Ehrenhausen | Bílé | 2017 | Erzherzog Johann |

6.3 Analýza vína pomocí fluorescenční spektroskopie

Byla připravena řada veškerých vzorků vín řaděných s vodou v koncentracích od 1 do 10 % obj. Naředěné vzorky byly přelity do křemenné kyvety a poté byla měřena excitace v oblasti vlnových délek od 250 do 500 nm a emise v oblasti 250 až 600 nm. Referenčním vzorkem byla použita voda, jako použité rozpouštědlo. Dále byla otevřena clona (shutter) a vzorek byl měřen na spektrofluorimetru. Výsledkem je fluorescenční profil excitačně-emisního spektra jednotlivých vzorků vín v měřené oblasti.

6.4 Stanovení polyfenolických látek pomocí HPLC

6.4.1 Extrakce a příprava vzorku

Nejdříve byly vzorky vín zředěny s 80% metanolem 1:1. Takto připravené vzorky byly následně zfiltrány do tmavých vialek přes nylonové mikrofiltry o velikosti pórů 0,22 μm . Po přefiltrování byly vialky umístěny do autosampleru kapalinového chromatografu.

6.4.2 Stanovení kalibračních křivek

Na analytických vahách byly naváženy standardy příslušných polyfenolických flavonoidů a kyselin s přesností na 0,1 mg. Poté byly kvantitativně převedeny do odměrných baněk o objemu 100 ml a dále byly doplněny redestilovanou vodou po rysku. Byl připraven jejich zásobní roztok o koncentraci 800 $\mu\text{g/ml}$. Z tohoto zásobního roztoku byla připravena pro každou látku kalibrační řada o koncentracích 50, 100, 200, 400 a 600 $\mu\text{g/ml}$. Roztoky byly proměřeny za specifických chromatografických podmínek.

6.4.3 Chromatografické stanovení polyfenolických kyselin

Chromatografické stanovení bylo provedeno na chromatografu UHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, MA, USA) s detektorem DAD, UV/VIS a autosamplrem. Pro stanovení byla použita kolona Phenomenex Kinetex C18 (150 x 4,6 mm; 5 μm).

Chromatografické podmínky:

- objem nástřiku na kolonu: 10 μl ,

- mobilní fáze A: 99/1: redestilovaná voda/kyselina octová ledová (99,8%),
- mobilní fáze B: 67/32/1: redestilovaná voda/acetonitril/kyselina octová ledová (99,8%),
- průtok: 1 ml/min,
- teplota kolony 30 °C,
- čas 45 min,
- eluce proběhla gradientově, v čase 0-10 min.

Tab. 4: Gradientová eluce

| čas (min) | B (%) |
|-----------|-------|
| 0–10 | 10–20 |
| 10–16 | 20–40 |
| 16–20 | 40–50 |
| 20–25 | 50–70 |
| 25–30 | 70 |
| 30–40 | 70–10 |
| 40–45 | 10 |

Vyhodocení chromatogramu proběhlo za použití vyhodnocovacího programu Chromeleon™ 7.2 Chromatography Data Systém (Thermo Scientifics, MA, USA). Byly odečteny plochy píku pro jednotlivé analyty v příslušném retenčním čase při vlnové délce 275 nm. Data byla poté vyhodnocena s použitím lineární regrese.

6.5 Doplnující stanovení

6.5.1 Analýza vína pomocí spektroskopie UV/VIS

Byla připravena řada jednotlivých vzorků od 1 do 10 % obj. stejně, jako je popsáno v kapitole 6.4. Vzorky byly měřeny v křemenných kyvetách na spektroskopu v rozsahu vlnových délek 200 až 700 nm.

6.5.2 Stanovení polyfenolů ve vínech s činidlem Folin-Ciocalteu

Ze standardního roztoku taninu bylo pipetováno do šesti 50ml odměrných baněk 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 ml roztoku. Současně byl odpipetován 1 ml čirého roztoku vína. Do všech odměrných baněk bylo přidáno 20 ml destilované vody, 1 ml činidla Folin-Ciocalteu a vše bylo promícháno. Po 3 minutách bylo přidáno 5 ml 20% roztoku Na_2CO_3 a po promíchání doplněno destilovanou vodou po rysku. Po 30 minutách byla měřena intenzita zbarvení v 10 mm kyvetě při 700 nm proti slepému pokusu s nulovým obsahem taninu. Z naměřených hodnot absorbancí byla provedena lineární závislost absorbance na koncentraci polyfenolů jako taninů. Obsah veškerých polyfenolů byl vyjádřen jako desítky mg taninu v 1000 ml vína [32,50].

6.5.3 Stanovení hustoty vína pyknometricky

Pro stanovení hustoty vína pyknometricky byly připraveny kalibrované 100ml pyknometry s úzkým hrdlem a zátkou podle Reischauera. Ty byly nejdříve několikrát propláchnuty zkoušeným vzorkem, naplněny a uzavřeny. Po uzavření byly temperovány na teplotu 20 °C po dobu 30 minut a byl kontrolován únik oxidu uhličitého, tvořící bublinky. Dále bylo odebráno takové množství vzorku, aby se spodní meniskus hladiny dotýkal značky pyknometru. Kapky na vnitřní straně hrdla nad značkou byly odsáty filtračním papírem a celý pyknometr byl osušen. Po 30 minutách byla stanovena hmotnost pyknometru se vzorkem bez zátky v gramech a to na čtyři desetinná místa na analytických vahách. Současně byla stanovena hmotnost příslušné kompenzační tára pyknometru opět na čtyři desetinná místa. Postup byl proveden dle metody EEC No 2676/90 [32,50].

Hustota vzorku při 20 °C vyjádřená na pět desetinných míst (g/ml):

$$\rho^{20} = \frac{m_{20}}{V_{20}} \quad (5)$$

kde: m_{20} – hmotnost při 20 °C (g),

V_{20} – objem při 20 °C (ml)

Výpočet hustoty vzorku vína (g/ml):

$$\rho_v = \frac{m_2 - m_1}{m_3 - m_1} \cdot \rho_{H_2O} \quad (6)$$

kde: m_1 – hmotnost prázdného vysušeného pyknometru (g),

m_2 – hmotnost naplněného pyknometru vzorkem vína (g),

m_3 – hmotnost pyknometru s vodou (g),

ρ_{H_2O} – hustota vody ≈ 1 (g/ml), dle tabulek 0,9982 mg/l při 20 °C [32,50,51].

7 VYHODNOCENÍ A DISKUZE VÝSLEDKŮ

7.1 Výsledky stanovení vín pomocí fluorescenční spektroskopie

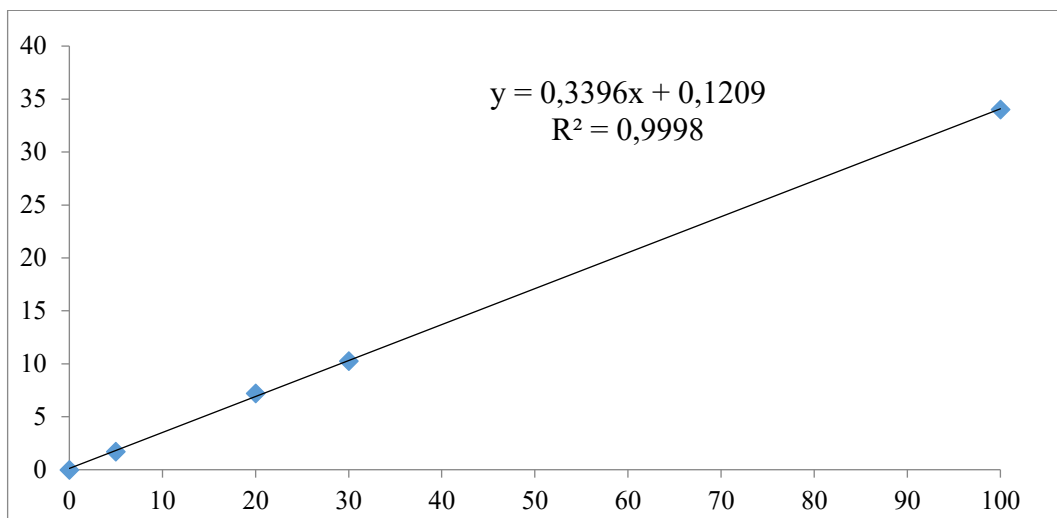
Bylo analyzováno osm vzorků tichých vín v koncentračním rozsahu od 1 do 10 % obj., včetně neředěného vzorku. Měření proběhlo za podmínek excitace v rozmezí 250 až 500 nm a emise v rozmezí 250 až 600 nm na fluorimetru Shimadzu. Měření proběhlo pro každý vzorek a koncentraci pětkrát. Pro vzorky vín byly stanoveny dvě skupiny excitačně-emisních párů píků, které odpovídají přítomnosti polyfenolických látek. Výsledky koncentrací při stanovených excitačně-emisních párů píků byly vyhodnoceny v 3D grafech v programu Sigma Plot 8.0, 2002 a jsou uvedeny v příloze, viz příloha 1. Dále byla vytvořena tabulka fluorescenční analýzy pro jednotlivá neředěná vína. V následující tabulce jsou uvedeny hodnoty aritmetických průměrů intenzity fluorescenčního záření a příslušných směrodatných odchylek.

*Tab. 5: Intenzita fluorescenčního záření pro vína z ČR, Slovenska a Rakouska
excitace/emise – 260/350 nm a excitace/emise 300/495 nm*

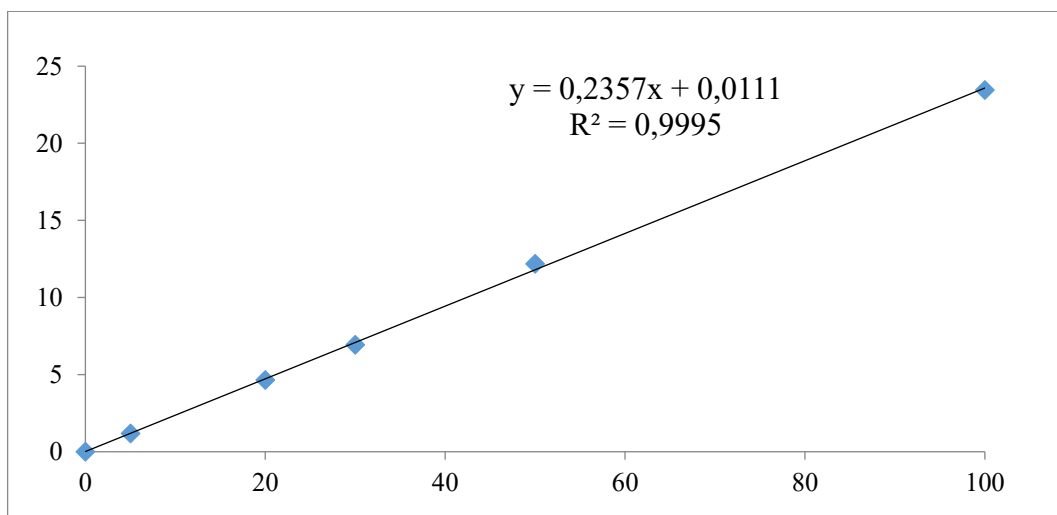
| Odrůda | I (a.u.) excitace (275 nm) | I (a.u.) emise (350 nm) | I (a.u.) excitace (300 nm) | I (a.u.) emise (495 nm) |
|-------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Veltlínské zelené | 7,11 ± 0,89 | 11,35 ± 1,68 | 19,61 ± 0,63 | 1016 ± 0,0 |
| Ryzlík vlašský | 30,32 ± 2,75 | 10,83 ± 1,20 | 23,61 ± 0,85 | 1019 ± 0,0 |
| Merlot | 4,01 ± 0,53 | 8,60 ± 1,01 | 18,49 ± 0,44 | 70,57 ± 17,83 |
| Veltlínské zelené | 27,20 ± 1,38 | 5,21 ± 1,57 | 17,41 ± 2,04 | 1049 ± 0,0 |
| Ryzlík vlašský | 25,49 ± 1,90 | 9,32 ± 0,95 | 20,60 ± 0,32 | 1021 ± 3,68 |
| Merlot | 6,39 ± 1,02 | 7,74 ± 1,29 | 20,95 ± 1,30 | 50,81 ± 4,19 |
| Gruner veltliner | 6,99 ± 0,58 | 1,04 ± 0,32 | 19,85 ± 1,23 | 1019 ± 0,0 |
| Weilscherriesling | 5,81 ± 0,73 | 2,03 ± 0,65 | 28,74 ± 1,45 | 1034 ± 0,0 |

7.2 Výsledky stanovení polyfenolických látek pomocí HPLC

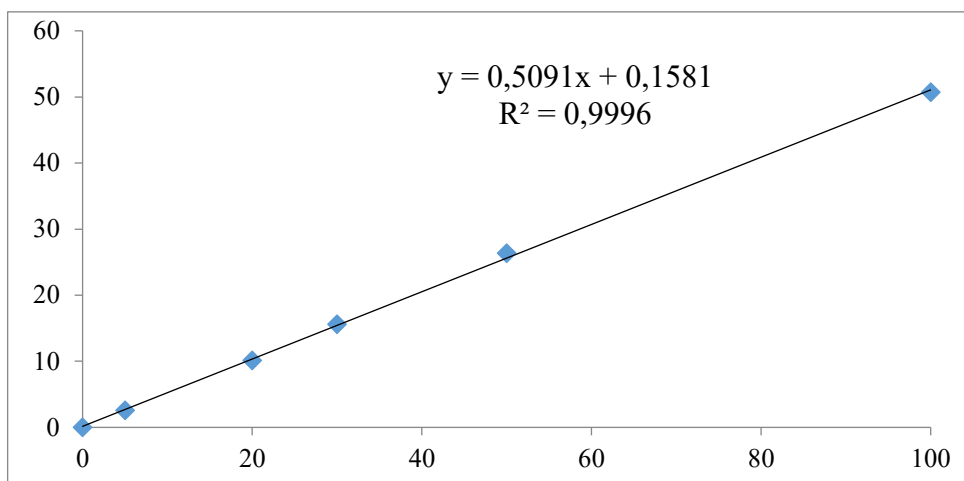
Byly proměřeny jednotlivé body standardů, ze kterých byly sestrojeny kalibrační křivky, konkrétně jsou uvedeny pod textem (obr.9–14). V tomto rozmezí byla závislost plochy píku na koncentraci příslušných kyselin lineární. Z rovnic lineární regrese byly následně vypočítány obsahy polyfenolických kyselin v $\mu\text{g/ml}$.



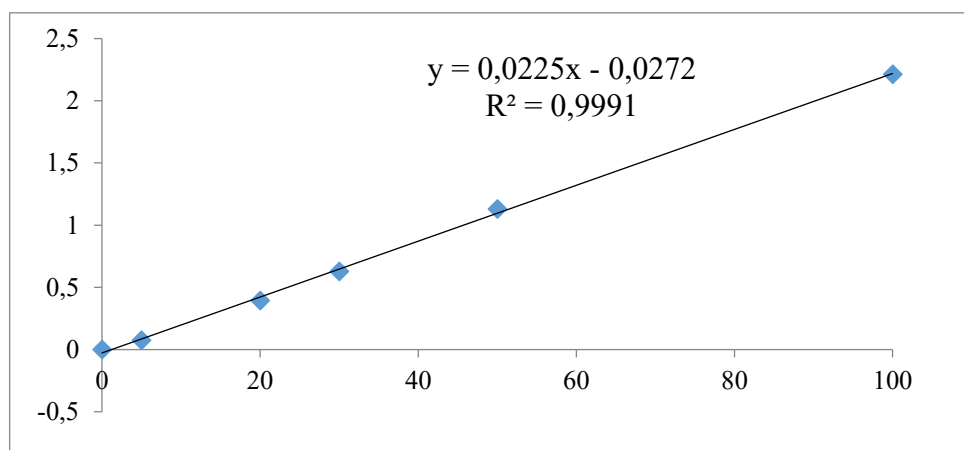
Obr. 8: Kalibrační křivka kyseliny gallové



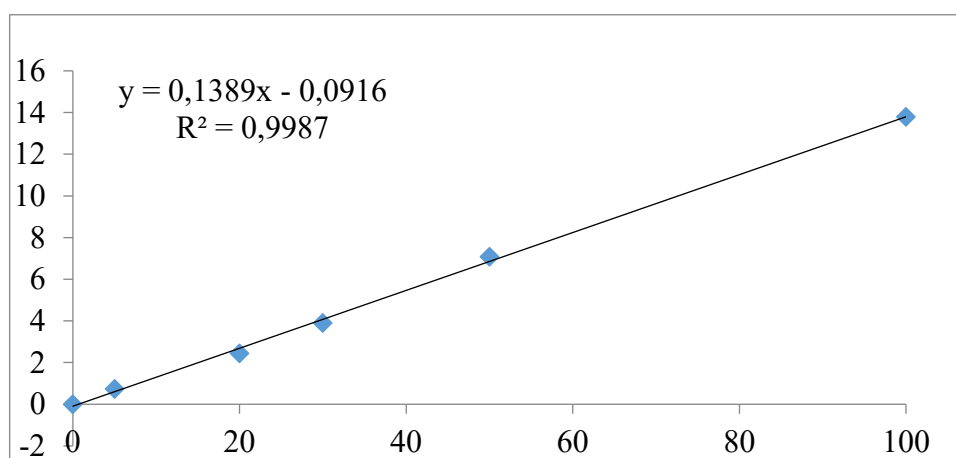
Obr. 9: Kalibrační křivka kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové



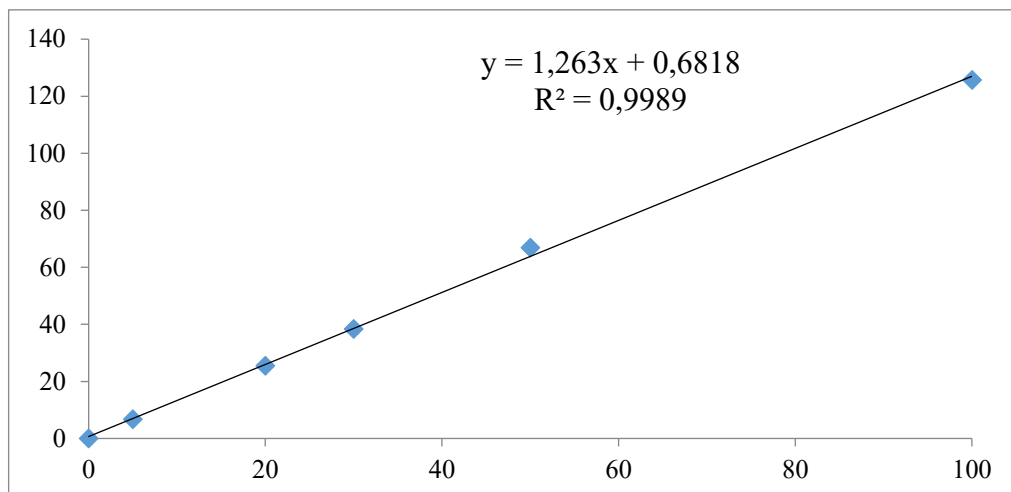
Obr. 10: Kalibrační křivka kyseliny 4-hydroxybenzoové



Obr. 11: Kalibrační křivka epigallokatechinu



Obr. 12: Kalibrační křivka epikatechinu



Obr. 13: Kalibrační křivka t-2-hydroxyskořicové kyseliny

Tab. 6: Výsledky stanovení vybraných polyfenolických kyselin metodou HPLC

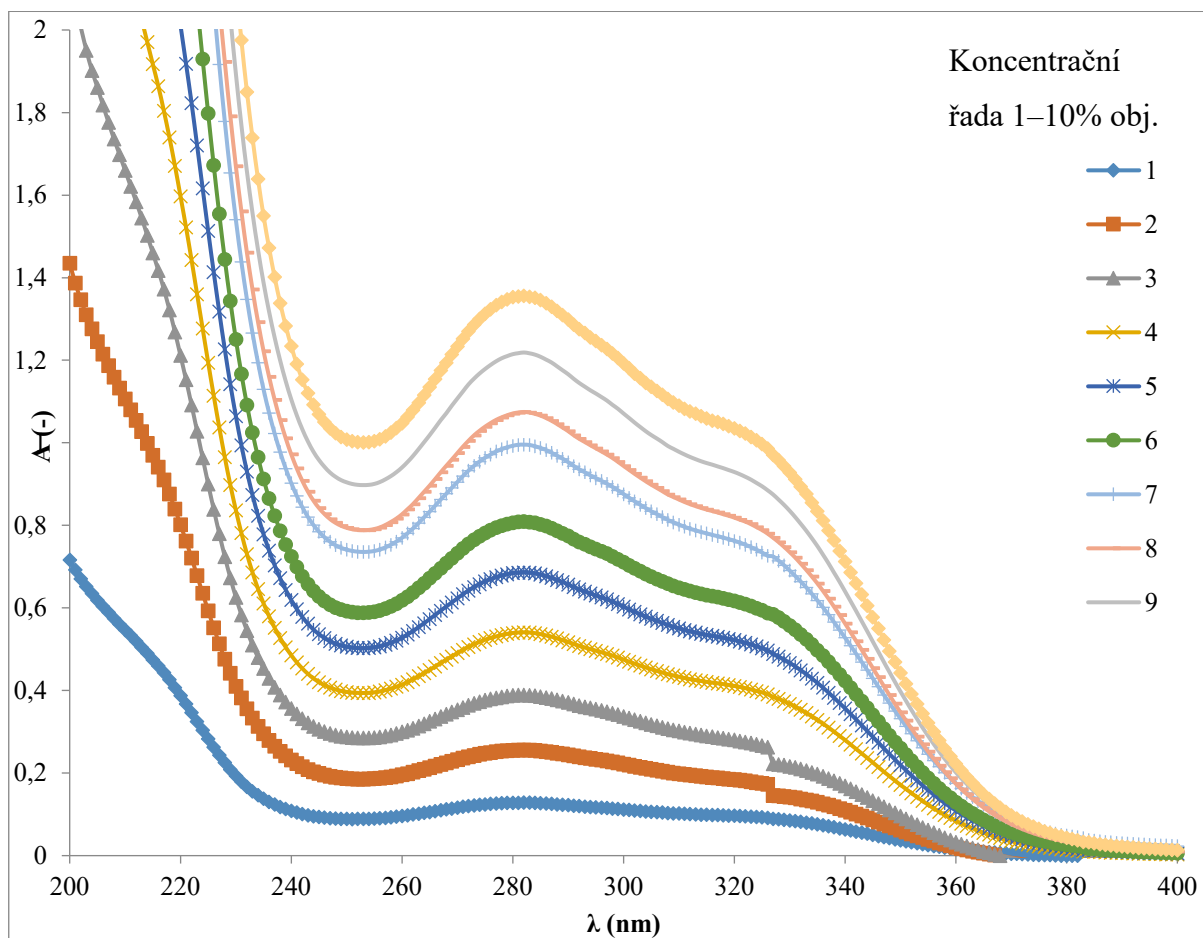
| Specifikace vína | | Obsah fenolických sloučenin ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | |
|--------------------------|------------------------|--|--------------------------------|----------------------------|--------------------|-------------------|-----------------------------|
| Odrůda vína | Oblast a podoblast | Kyselina gall-ová | Kyselina 3,4-dihydroxybenzoová | Kyselina 4-hydroxybenzoová | Epigallokatechin | Epikatechin | Kyselina 2-hydroxyskořicová |
| Veltlínské zelené | Morava, Slovácká | $32,571 \pm 0,043$ | $4,785 \pm 0,127$ | $3,192 \pm 0,035$ | $46,317 \pm 0,412$ | $1,168 \pm 0,053$ | $0,059 \pm 0,002$ |
| Ryzlink vlašský | Morava, Slovácká | $1,006 \pm 0,030$ | $5,009 \pm 0,150$ | $2,704 \pm 0,037$ | $38,857 \pm 0,346$ | $1,730 \pm 0,163$ | $0,110 \pm 0,004$ |
| Merlot | Morava, Slovácká | $45,526 \pm 0,092$ | $5,425 \pm 0,033$ | $8,422 \pm 0,130$ | $26,240 \pm 2,236$ | $0,834 \pm 0,232$ | $0,231 \pm 0,011$ |
| Veltlínské zelené | Malokarpatská, Skalica | $5,232 \pm 0,054$ | $1,727 \pm 0,110$ | $2,783 \pm 0,062$ | $46,661 \pm 1,304$ | $1,160 \pm 0,072$ | $0,083 \pm 0,024$ |
| Ryzlink vlašský | Malokarpatská, Skalica | $0,813 \pm 0,012$ | $2,826 \pm 0,149$ | $1,727 \pm 0,061$ | $22,966 \pm 0,760$ | $0,967 \pm 0,109$ | $0,106 \pm 0,012$ |
| Merlot | Malokarpatská, Skalica | $12,721 \pm 0,064$ | $4,589 \pm 0,479$ | $1,820 \pm 0,083$ | $34,538 \pm 3,280$ | $1,836 \pm 0,353$ | $0,265 \pm 0,010$ |
| Grüner Veltliner | Rakousko, Weinviertel | $0,733 \pm 0,020$ | $1,662 \pm 0,351$ | $0,599 \pm 0,057$ | $32,079 \pm 1,067$ | $1,143 \pm 0,163$ | $0,072 \pm 0,006$ |
| Welschriesling | Rakousko | $0,588 \pm 0,086$ | $4,730 \pm 0,318$ | $2,389 \pm 0,256$ | $15,803 \pm 2,772$ | $0,664 \pm 0,030$ | $0,060 \pm 0,003$ |

7.3 Ostatní výsledky stanovení

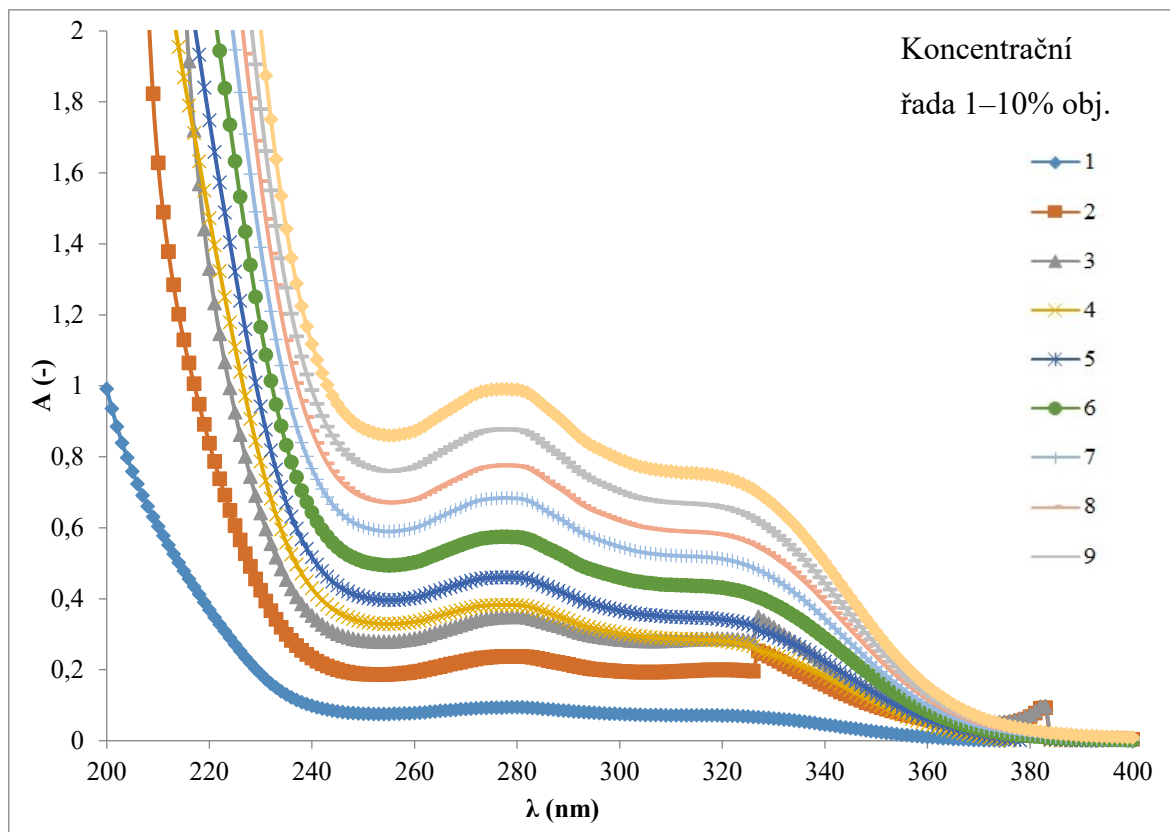
7.3.1 Výsledky spektrofotometrického stanovení polyfenolických látek UV/VIS

Na spektrofotometru Lambda 25 byly pro porovnání naměřeny jednotlivé absorbance vzorků vín v koncentrační řadě 1 až 10 % obj.

Jako příklad UV/VIS měření jsou znázorněny grafy dvou vzorků vín na obrázku 14 a 15, konkrétně Veltlínské zelené, Ryzlink vlašský z Petrova.



Obr. 14: Závislost absorpance na vlnové délce (Veltlínské zelené, Petrov, 2017)

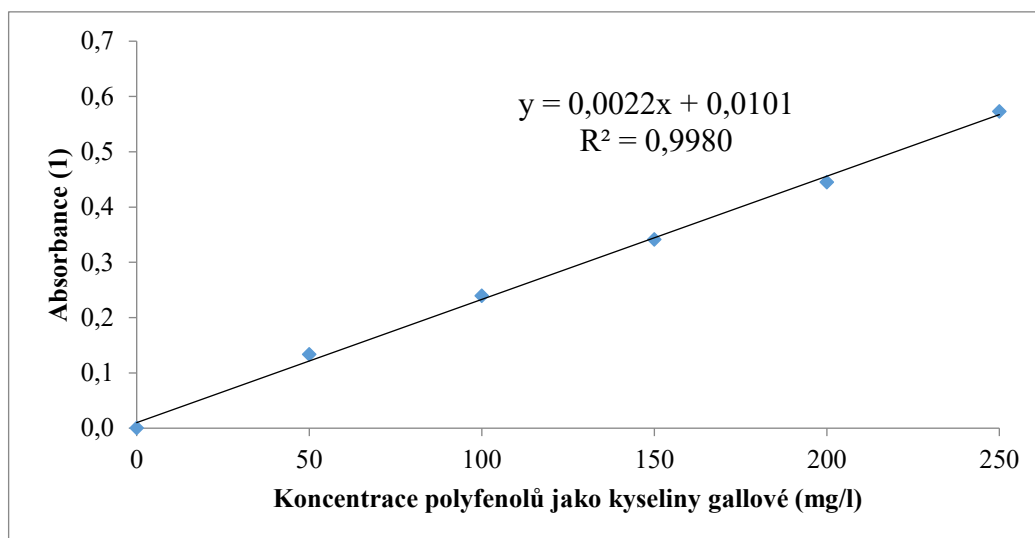


Obr. 15: Závislost absorbance na vlnové délce (Ryzlink vlašský, Petrov, 2017)

7.3.2 Výsledky stanovení polyfenolických látek ve vínech s činidlem Folin-Ciocalteu

Vyhodnocení bylo provedeno na základě výpočtů z rovnice kalibrační přímky (obr. 16), která je vyjádřena jako závislost absorbance na koncentraci polyfenolů vyjádřených jako kyselina gallová (mg/l). Průměrné hodnoty jsou uvedeny v tabulce včetně směrodatných odchylek. Hodnota spolehlivosti R^2 činila 0,998, což je dostatečně vysoká hodnota, a rovnice lineární regrese má podobu $y = 0,0022x + 0,0101$.

Naměřené hodnoty absorbance s přepočtem na koncentraci polyfenolických látek ve víně v mg/l a jsou uvedeny v tabulce 8.



Obr. 16: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci polyfenolů

Tab. 7: Koncentrace polyfenolických látek ve vybraných vzorcích vína

| Druh vína | Oblast | Průměrná absorbance ± SD (1) | Koncentrace (mg/l) |
|-------------------|---------------|------------------------------|--------------------|
| Veltlínské zelené | Morava | 0,862 ± 0,001 | 387 |
| Ryzlink vlašský | Morava | 0,579 ± 0,006 | 259 |
| Merlot | Morava | 0,876 ± 0,002 | 1968 |
| Veltlínské zelené | Malokarpatská | 0,754 ± 0,005 | 338 |
| Ryzlink vlašský | Malokarpatská | 0,497 ± 0,001 | 221 |
| Merlot | Malokarpatská | 0,529 ± 0,006 | 1179 |
| Grüner veltliner | Weinviertel | 0,225 ± 0,002 | 98 |
| Weilchsriesling | Steiermark | 0,067 ± 0,001 | 26 |

7.3.3 Výsledky stanovení hustoty vína pyknometricky

Byla stanovena hustota jednotlivých vzorků vín. Víno obsahuje alkohol, který má menší hustotu než destilovaná voda. Z tohoto důvodu je stanovená hustota vzorků vín nižší než 1

g/ml. Rozdíly v hodnotách hustot měřených vín souvisí s obsahem alkoholu a oxidu siřičitého v konkrétních typech vína.

Tab. 8: Výsledky stanovení hustoty vína pyknometricky

| Druh vína | Oblast | Hustota (g/ml) |
|-------------------|---------------|-----------------|
| Veltlínské zelené | Morava | 0,9948 ± 0,0417 |
| Ryzlink vlašský | Morava | 0,9967 ± 0,0421 |
| Merlot | Morava | 0,9981 ± 0,0426 |
| Veltlínské zelené | Malokarpatská | 0,9929 ± 0,0422 |
| Ryzlink vlašský | Malokarpatská | 0,9968 ± 0,0415 |
| Merlot | Malokarpatská | 0,9980 ± 0,0426 |
| Grüner veltliner | Weinviertel | 0,9892 ± 0,0401 |
| Weilchsriesling | Steiermark | 0,9952 ± 0,0421 |

7.4 Souhrnná diskuze výsledků

Byl vyhodnocen excitačně-emisní profil různých odrůd vín, jež pocházejí z několika vinařských oblastí. Daná vína byla zředěna destilovanou vodou v koncentračním rozmezí 1 až 10 % obj., aby bylo dosaženo optimální intenzity fluorescenčního záření. V příslušné oblasti excitačních a emisních vlnových délek byla detekována přítomnost fluorescenčních látek (excitační a emisní píky), které odpovídají komplexu charakteristických sloučenin obsažených ve zkoumaných vínech.

Pro vzorky vín byly stanoveny dvě skupiny excitačně-emisních párů píků, které odpovídají přítomnosti polyfenolických látek: 270-285 nm/350-380 nm (excitace/emise), resp. 300-305 nm/495-505 nm. V literatuře uváděné hodnoty vlnových délek excitačně-emisního záření vín, které se vztahují k polyfenolům, činí 250-350 nm/275-450 nm (Dufour a kol., 2006) [51]. Pozice maxima excitačního i emisního píku silně závisí na druhu vína a jeho zředění, detekované hodnoty píků jsou proto uváděny v určitém rozpětí vlnových délek. Využití polárního rozpouštědla (destilované vody) může navíc způsobit posun k vyšším

vlnovým délkám, což vysvětluje poněkud vyšší hodnotu píků emisního záření kolem 495 nm.

Je potřeba si také uvědomit, že polyfenoly ve víně tvoří široký komplex fluorescenčních molekul rozmanité struktury a rozměrů (monomery až polymery). Skladba a množství polyfenolů se liší v závislosti na typu odrůdy, zralosti hroznů, zpracování vína a jeho stáří (ročníku) a předurčuje excitačně-emisní profil daného vzorku (Dufour a kol., 2006) [51]. Kromě řady fenolických sloučenin (fenolických kyselin, flavonoidů, stilbenů) obsahují vína také další fluorescenční látky, jako antokyaniny, bílkoviny a vitaminy. Fluorescenční spektra poskytují z obecného hlediska informaci o sloučeninách obsahujících násobné vazby. Je tudíž zřejmé, že každé excitačně-emisní (spektrální) pásmo vína odpovídá určité skupině fluorescenčních látek, a nikoliv nutně jen jedinému fluoroforu (Sádecká a kol., 2018) [52]. Stanovené excitačně-emisní píky měřených vín tedy pravděpodobně odpovídají komplexu různých polyfenolických sloučenin přítomných ve zkoumaných vínech.

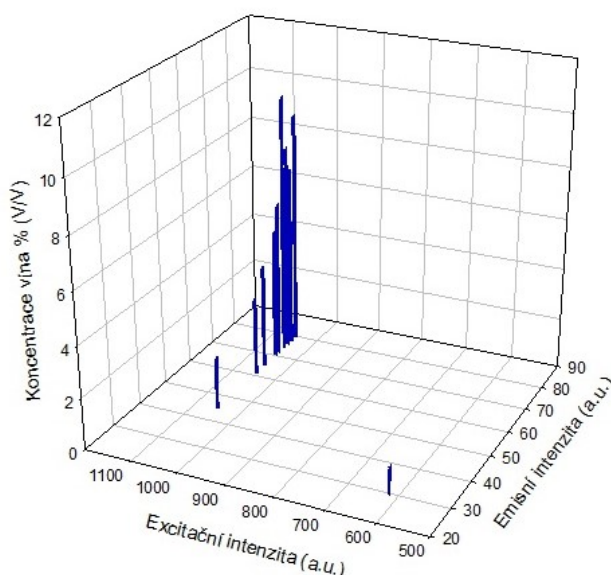
V případě ředění vín nelze u některých vzorků závislost intenzity excitačního a emisního záření na koncentraci vína generalizovat. U jiných vín se naopak projevil charakteristický trend znázorněný přehledně v 3D grafech excitačně-emisních profilů, které jsou uvedeny v příloze 1. Některá vína vykazují nárůst intenzity emisního záření s rostoucí koncentrací, což je dáno narůstajícím obsahem fluorescenčních látek (fluoroforů) emitujících záření specifické vlnové délky. Příkladem takového vína je ryzlink vlašský (2017, Skalica) měřený při excitační vlnové délce 270-285 nm a emitující odpovídající záření v rozmezí 350-380 nm (viz obrázek 1). Hodnota emisního záření při daných vlnových délkách narůstá plynule s koncentrací také pro Grüner Veltliner (2017, Rakousko), díky vzrůstajícímu obsahu příslušných fluoroforů, jak je znázorněno na obrázku 17.

Naopak Merlot (2015, Blatnice), vykazuje při vlnových délkách kolem 275 nm/378 nm (excitace/emise) pozvolný pokles intenzity emisního záření s rostoucí koncentrací vína, jak lze vidět na obrázku 18. Tato skutečnost je dána tzv. efektem vnitřního filtru (inner filter phenomena), jak uvádí ve své studii o fluorescenční spektroskopii vín J. Sádecká a kol. (2018) [52]. Snížení intenzity fluorescenčního záření spočívá v absorpci excitačního anebo emisního záření matrixem vzorku či samotným fluoroforem. V případě zředěných vín zde důležitou roli hraje také vysoký obsah vody a interakce jejích molekul s přítomnými komplexy fluorescenčních látek či vzájemné interakce molekul vody mezi sebou, např. působením vodíkových můstků. Jak uvádí autoři výše uvedené studie, zředěním vzorku vína vhodným rozpouštědlem (destilovanou vodou) na relativně nízké koncentrace (0,2 % w/w

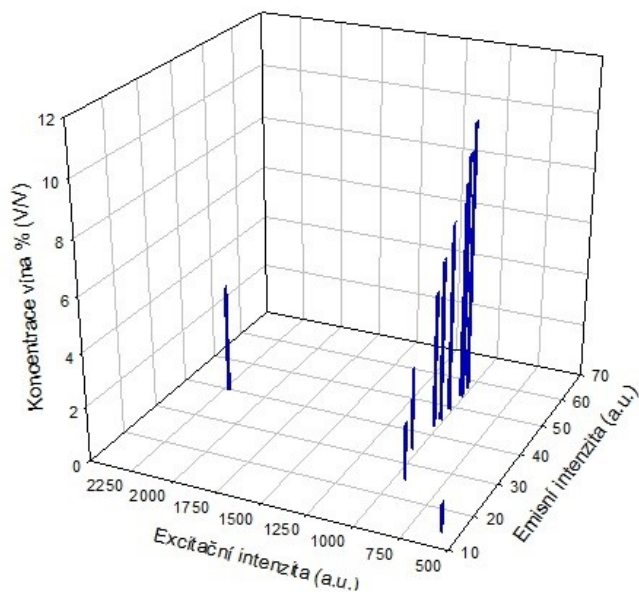
a méně) lze překonat efekt vnitřního filtru a dosáhnout lineární závislosti intenzity fluorescenčního záření na koncentraci vína. Z praktického hlediska však může být detekce excitačně-emisních spekter takových velmi zředěných vín problematická (může nastat pokles fluoroforů pod detekční limit použitého přístroje).

Získané výsledky píků excitačně-emisního záření se poměrně dobře shodují s daty uváděnými J. Sádeckou a kol. (2018) pro zředěná botrytizovaná vína o koncentraci 0,2 % (w/w); luminiscenční spektra těchto vín vykazovala intenzivní spektrální pásmo v oblasti excitačních vlnových délek 270-280 nm a 300-320 nm a jim odpovídajících emisních vlnových délek 350 nm, resp. 430-450 nm [52].

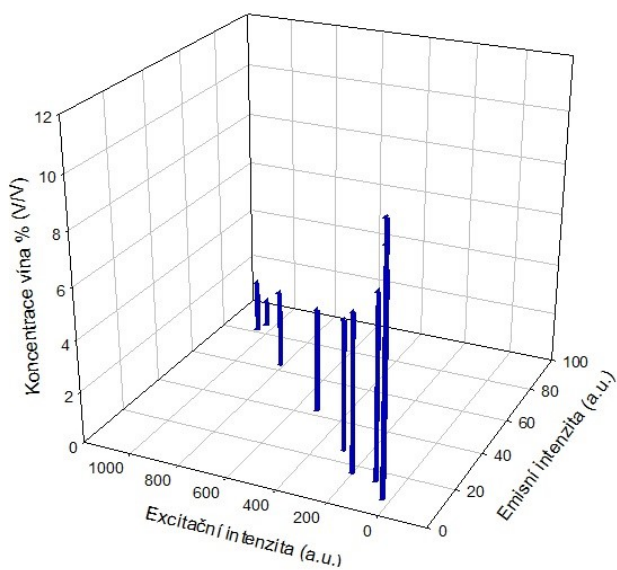
Uvedené hodnoty do značné míry korespondují s píky prezentovanými v této diplomové práci: 270-285 nm/350-380 nm, 300-305 nm/495-505 nm (excitace/emise). V případě excitačně-emisních párů 270-285 nm/350-380 nm lze usuzovat na přítomnost fenolických kyselin (kyseliny gallové a protokatechové), hydroxyskořicových kyselin (jako je kyselina kaftarová a koutarová) a monomerních katechinů (polyfenolických látek řazených mezi flavonoidy), jak také uvádí ostatní vědecké studie, např. články autorů Airado-Rodríguez a kol. (2011) a Bravo a kol. (2006) [53,54]. U excitačně-emisních párů 300-305 nm/495-505 nm můžeme předpokládat, že se tyto píky vztahují k přítomnosti hydroxybenzoových kyselin jako je kyselina gentisová (je typická pro odrůdu bílých vín ryzlink) či kyselina p-kumarová (Ma a kol., 2014; Pour Nikfardjam a kol., 2003) [55,56].



Obr. 17: Veltlínské zelené (2017), Skalica
(excitace 270–282 nm, emise 350–380 nm)



Obr. 18: Gruner veltliner, 2017, Rakousko,
(excitace 266–284, emise 378 nm)



Obr. 19: Merlot, 2015, Blatnice,
(excitace 266–284 nm, emise 378 nm)

Pomocí metody HPLC byl určen obsah konkrétních polyfenolických sloučenin ve všech vzorcích vín. Ze získaných výsledků je patrné, že nejvíce zastoupenou sloučeninou je epigallokatechin, jehož koncentrace se pohybovala v rozmezí cca 20 až 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Dalšími

významnými polyfenoly jsou kyselina gallová, kyselina 3,4-dihydroxybenzoová a 4-hydroxybenzoová. V menší míře byl ve vzorcích vín zastoupen též epikatechin a kyselina 2-hydroxyskořicová, jejichž maximální koncentrace nepřesahovala 2 µg/ml. V nepatrném množství byly ve vzorcích přítomny některé další polyfenoly, jako např. resveratrol, kyselina skořicová, aj.

Pomocí měření na spektrofotometru Lambda 25 byla detekována přítomnost polyfenolických sloučenin obsažených ve vzorcích vína. Odpovídající absorbanční pík byl stanoven při vlnové délce cca 280 nm pro koncentraci vína s 5 a více objemovými procenty. Byla-li koncentrace vína nižší než 5 % obj., daný pík bylo obtížné detekovat (tzv. shallow peak). Na základě této metody jsme prokázali přítomnost polyfenolických látek ve vzorcích zkoumaných vín, což koresponduje s ostatními měřeními provedenými v této diplomové práci, konkrétně s fluorescenční spektroskopií vzorků [57].

Pomocí stanovení celkových polyfenolických látek dle Folin-Ciocalteua se podařilo stanovit koncentraci polyfenolických sloučenin ve vzorcích jak bílých, tak červených vín. Balík a Stávek (2017) uvádějí, že obsah polyfenolických látek v bílých vínech je obsažen přibližně okolo 300 mg/l [1]. Tyto hodnoty se víceméně shodují s koncentrací polyfenolů stanovených pro bílá vína v této diplomové práci. Např. pro Ryzlink vlašský z oblasti Morava a z Malokarpatské vinařské oblasti se stanovené hodnoty koncentrace pohybovaly v rozmezí 200 až 300 mg/l. V případě rakouských bílých vín činila maximální koncentrace cca 100 mg/l, což může být způsobeno klimatickými podmínkami, způsobem zpracování vinných hroznů (lisování) a dalšími faktory. V případě červených vín bylo získané hodnoty porovnat s publikací Steidla (2010). Uvedený autor uvádí, že koncentrace polyfenolů v červených vínech může dosahovat až hodnoty 4500 mg/l. Pro zkoumaná vína merlot byla stanovena relativně vysoká koncentrace polyfenolů, která činila 1200 (Skalica), resp. téměř 2000 mg/l (Petrov) [4].

7.5 Statistické zpracování dat

Ke statistické analýze byla využita všechna zkoumaná vína, která byla rozdělena podle odrůdy a místa původu, resp. ročníku. Byla hodnocena statistická závislost výskytu polyfenolů ve vínech, tj. obsahu charakteristických sloučenin detekovaných pomocí fluorescenční spektroskopie, HPLC metody a UV/VIS spektrometrie. Jako nejvhodnější metoda k

určení statistické závislosti obsahu fenolických sloučenin se jeví měření absorbance na UV/VIS spektrometru při specifických vlnových délkách. Na základě získaných hodnot absorbovaného záření bylo možné porovnat výskyt polyfenolů v závislosti na typu odrůdy a původu vína (vinařské oblasti a ročníku). V případě koncentrace polyfenolů v červených i bílých vínech, jež byla vyjádřena jako tanin (mg/l), byly ověřeny statistické odchylky v absorbanci vzhledem k odrůdě a původu každého vína. Současně byla zkoumána statistická závislost hustoty jednotlivých vín (g/ml), tj. zda se významně liší hustota různých odrůd, případně hustota totožných odrůd pocházejících z různých vinařských oblastí.

Cílem hodnocení bylo ověřit či zamítnout platnost nulté hypotézy H_0 , která považuje rozdíl v hodnotách mezi vzorky za statisticky nevýznamný. Jinými slovy, nultá hypotéza předpokládá, že zkoumané charakteristiky vzorků vína se od sebe v zásadě neliší a rozdíl mezi nimi může být dán náhodnou chybou měření (tzv. šumem). V protikladu k nulté hypotéze klademe alternativní hypotézu H_1 , která tvrdí, že mezi vzorky na stanovené hladině významnosti α existují statisticky významné rozdíly. V případě zamítnutí hypotézy H_0 přijímáme hypotézu H_1 jako pravdivou.

Získané výsledky byly statisticky ověřeny na hladině významnosti $\alpha = 5\%$, která určuje pravděpodobnost nesprávného zamítnutí nulté hypotézy v případě, že H_0 platí. K otestování byla využita metoda ANOVA (analýza variability), konkrétně ANOVA jednofaktorová a ANOVA dvoufaktorová s opakováním (je využívána pro více výchozích dat a faktorů). Prvním testovaným faktorem byla odrůda vína (Veltlínské zelené, Ryzlink vlašský, Merlot), druhým uvažovaným faktorem byl původ vína, tedy země a ročník. V případě Veltlínského zeleného a Ryzlinku vlašského (oba ročník 2017) jsme rozlišovali vína z Rakouska, vína z České republiky (Petrov, moravská vinařská oblast) a vína ze Slovenska (Skalica, malokarpatská vinařská oblast). U červeného vína Merlot byla vybrána česká vína z Blatnice (moravská vinařská oblast) a slovenská vína ze Skalice (obě ročník 2015), jež byla porovnána mezi sebou i s odrůdami bílých vín.

Na základě provedené statistiky byla dosažena hladina statistické významnosti P , vyjadřující pravděpodobnost nulté hypotézy. Dále byla zjištěna hodnota testového kritéria F (Fischerovy distribuce dat) a kritická hodnota F , která určuje, zda získané výsledky leží v oblasti platnosti nulté hypotézy.

Výsledky statistické analýzy prokázaly, že obsah polyfenolických látek (detekovaných měřením absorbance a pomocí dalších technik), resp. hodnoty rozdílů tohoto obsahu jsou

statisticky významné mezi všemi vzorky testovaných vín. Podařilo se nám tedy prokázat, že vliv zkoumaných faktorů (odrůdy vína a jeho původu) na výskyt fenolických sloučenin existuje a rozdíl v hodnotách obsahu polyfenolů (vyjádřeného s využitím Folin-Ciocalteuova stanovení v mg/l) není náhodný. Hypotéza H_0 tak byla zamítnuta, neboť hodnota P pro jednotlivá stanovení činila méně než 0,05 (zvolená hladina významnosti α) a hodnota F byla vyšší než F kritická. Příklad obdržených výsledků statistické analýzy pro Veltlínské zelené a Ryzlink vlašský pocházejících z totožných i rozdílných vinařských oblastí podává tab. č. 1. V uvedené tabulce zjevně nízké hodnoty dosažené hladiny významnosti P (v řádu 10-17 a nižší) svědčí o nepatrné pravděpodobnosti, že by rozdíly v hodnotách koncentrace polyfenolů byly způsobeny chybami měření. Jako platnou tedy můžeme přijmout alternativní hypotéza H_1 , tedy že se vzorky vín statisticky významně lišily.

V případě hustoty se naopak nepodařilo prokázat, že by se hustota měřených vín lišila v závislosti na odrůdě a původu vína, jak také dokazuje tab. č. 2. Pro veškerá vína byla hodnota testového kritéria F podstatně nižší než F kritická. Vzhledem ke skutečnosti, že se dosažená hladina významnosti P blížila 100 %, lze téměř s absolutní jistotou konstatovat, že odchylky v hustotách vzorků jsou statisticky nevýznamné. Rozdíly na zvolené hladině významnosti α jsou tedy zanedbatelné, a to i u různých odrůd vín z odlišných vinařských oblastí.

Závěrem lze konstatovat, že obsah polyfenolických sloučenin byl na rozdíl od hustoty statisticky významně ovlivněn odrůdou vína a jeho původem. Dokonce i v případě stejné odrůdy a stejného ročníku vína pocházejícího z různých vinařských oblastí byl obsah polyfenolů prokazatelně odlišný.

Tab. 9: Tab. 1. Příklad výsledků metody ANOVA pro posouzení obsahu polyfenolů v testovaných vzorcích Veltlínského zeleného a Ryzlinku vlašského

| ANOVA dvoufaktorová s opakováním | | | |
|---|----------|-------------------------|-------------------|
| <i>Zdroj variability</i> | <i>F</i> | <i>Hodnota P</i> | <i>F kritická</i> |
| Výběr (různé odrůdy, stejná vinařská oblast a ročník) | 23952 | $2,467 \times 10^{-22}$ | 3,885 |
| Sloupce (stejně odrůdy a ročník, různá vinařská oblast) | 7870 | $2,811 \times 10^{-18}$ | 4,747 |
| Interakce (různé odrůdy a odlišné vinařské oblasti) | 3094 | $5,254 \times 10^{-17}$ | 3,885 |

Tab. 10: Příklad výsledků metody ANOVA pro posouzení hustoty všech testovaných vín z moravské a malokarpatské oblasti (použita data pyknometricky stanovené hustoty)

| ANOVA dvoufaktorová s opakováním | | | |
|---|----------|------------------|-------------------|
| <i>Zdroj variability</i> | <i>F</i> | <i>Hodnota P</i> | <i>F kritická</i> |
| Výběr (různé odrůdy a ročník, stejná vinařská oblast) | 0,001157 | 0,9732 | 4,414 |
| Sloupce (stejně odrůdy a ročník, různá vinařská oblast) | 0,015505 | 0,9846 | 3,555 |
| Interakce (různé odrůdy a odlišné vinařské oblasti) | 0,001017 | 0,9990 | 3,555 |

ZÁVĚR

Stanovení polyfenolických látek v různých potravinách a nápojích je významné z hlediska posouzení zdravotní prospěšnosti jejich konzumace. Z tohoto důvodu byly v předkládané diplomové práci analyzovány vzorky tichých vín.

K výzkumu daných vzorků byly využity spektroskopické techniky, konkrétně fluorescenční spektrometrie a UV/VIS měření absorbance. Ke konkrétnímu stanovení specifických sloučenin byla využita chromatografická metoda HPLC.

Hlavním záměrem bylo prokázat výskyt polyfenolických sloučenin ve vzorcích vín a jejich eventuální závislost na typu odrůdy a původu vína.

Pro dokonalejší hodnocení by bylo vhodné doplnit informace obsahu zbytkového cukru, alkoholu a oxidu siřičitého, které mají na jednotlivé výsledky stanovení podstatný vliv, ale toto nebylo cílem této diplomové práce. Tato stanovení také nebyla provedena z časové náročnosti metod stanovení a z tohoto hlediska by byly také nad rámec této diplomové práce.

Získané výsledky prokázaly, že přítomnost a obsah polyfenolických látek jako typických sloučenin obsažených v tichých vínech se liší v závislosti na odrůdě a jejich původu. V daných vínech jsou kromě polyfenolů obsaženy také další specifické látky jako vitaminy, antokyany a bílkoviny. Charakterizování těchto sloučenin nabízí širokou možnost dalšího výzkumu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BALÍK, Josef a Jan STÁVEK. Vinařská technologie. Valtice: Národní vinařské centrum, 2017. ISBN 978-80-87498-77-4.
- [2] FIC, Vlastimil. Víno: analýza, technologie, gastronomie. Český Těšín: 2 THETA, 2015. ISBN 9788086380773
- [3] KRAUS, Vilém, Zuzana FOFFOVÁ a Bohumil WURM. Nová encyklopedie českého a moravského vína. Praha: Praga Mystica, 2008. ISBN 978-808676709-3.
- [4] STEIDL, Robert. Sklepní hospodářství. V českém jazyce vyd. 2., aktualiz. Přeložil Jiří SEDLO. Valtice: Národní vinařské centrum, 2010. ISBN 9788090320192.
- [5] CALDERONE, Giovanni, Norbert NAULET, Claude GUILLOU a Fabiano RENIERO. Characterization of European Wine Glycerol: Stable Carbon Isotope Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2004, 52(19), 5902-5906 [cit. 2019-02-13]. DOI: 10.1021/jf049658c. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf049658c>
- [6] DEL ÁLAMO, María, Ignacio NEVARES, Laura GALLEGO, Brígida FERNÁNDEZ DE SIMÓN a Estrella CADAHÍA. Micro-oxygenation strategy depends on origin and size of oak chips or staves during accelerated red wine aging. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2010, 660(1-2), 92-101 [cit. 2019-02-13]. DOI: 10.1016/j.aca.2009.11.044. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267009015554>
- [7] Nařízení Komise (ES) č. 606/2009, kterým se stanoví některá prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 479/2008, pokud jde o druhy výrobků z révy vinné, enologické postupy a omezení, která se na ně použijí, v platném znění.
- [8] ALMEIDA, C. Marisa R. a M. Teresa S. D. VASCONCELOS. Multielement Composition of Wines and Their Precursors Including Provenance Soil and Their Potentialities As Fingerprints of Wine Origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2003, 51(16), 4788-4798 [cit. 2019-02-13]. DOI: 10.1021/jf034145b. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf034145b>

- [9] Wine Science [online]. Elsevier, 2008 [cit. 2019-03-22]. DOI: 10.1016/B978-0-12-373646-8.X5001-X. ISBN 9780123736468.
- [10] PAVLOUŠEK, Pavel. Pěstování révy vinné: moderní vinohradnictví. Praha: Grada, c2011. ISBN 978-80-247-3314-2.
- [11] Balík, J., 2010. Anthokyanová barviva v hroznech a vínech. 3. vyd. Brno: Folia Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis.
- [12] MICHLOVSKÝ, Miloš. *Lexikon chemického složení vína: příručka praktického vinaře*. Rakvice: Vinselekt Michlovský, 2014. ISBN 978-80-905319-2-5.
- [13] RODRÍGUEZ-DELGADO, Miguel-Ángel, Guillermo GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, José-Elías CONDE-GONZÁLEZ a Juan-Pedro PÉREZ-TRUJILLO. Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines. *Food Chemistry* [online]. 2002, 78(4), 523-532 [cit. 2019-03-22]. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00206-6. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814602002066>
- [14] MICHLOVSKÝ, Miloš. *Bobule*. Rakvice: Vinselekt Michlovský, 2014. ISBN 978-80-905319-3-2.
- [15] SUMCZYNSKI, Daniela. *Jakost netradičních surovin a jejich využitelnost v technologii výroby cereálních směsí: Quality of non-traditional raw materials and their application in the technology of cereal mixtures* : teze habilitační práce. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2017. ISBN 978-80-7454-644-0.
- [16] Zákon č. 26/2017 Sb., kterým se mění zákon č. 321/2004 Sb., o vinohradnictví a vinařství a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů.
- [17] Vinařský zákon a malovinaři a Malovinaři ve znění platných zákonů. Bořetické listy, 2017, 2017(1).
- [18] Vinařský Fond. Vinařský Fond [online]. 2002 [cit. 2019-05-02]. Dostupné z: www.vinarskyfond.cz
- [19] PAVLOUŠEK, Pavel. Výroba vína u malovinařů. 2., aktualiz. a rozš. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3487-3.

- [20] CANONICO, L., COMITINI, F., CIANI, M., 2015. Influence of Vintage and Selected Starter on *Torulaspora Delbrueckii*/*Saccharomyces Cerevisiae* Sequential Fermentation. *European Food Research and Technology*, 241(6), 827-833.
- [21] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vyd., ve VP 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0571-6.
- [22] PAVLOUŠEK, Pavel a Pavla BUREŠOVÁ. *Vše, co byste měli vědět o víně: --a nemáte se koho zeptat*. Praha: Grada, 2015. ISBN 978-80-247-4351-6.
- [23] STEIDL, Robert a Wolfgang RENNEN. *Moderní příprava červeného vína*. 2. vyd. Valtice: Národní vinařské centrum, 2006. ISBN 9788090320178.
- [24] Vyhláška č. 88/2017 Sb. Vyhláška o provedení některých ustanovení zákona o vinohradnictví a vinařství č. 321/2004 Sb., o vinohradnictví a vinařství ve znění pozdějších předpisů.
- [25] JACKSON, Ron S. *Wine science: principles, practice, perception*. 2nd ed. San Diego: Academic Press, c2000. ISBN 978-0-12-379062-0.
- [26] VOGEL, Wolfgang. *Víno z vlastního sklepa: pro začínající i zkušené výrobce domácího vína*. Líbeznice: Víkend, 2010. ISBN 9788074330261.
- [27] SPENCE, Godfrey. *Bílé víno: průvodce pro znalce*. Praha: Slovart, 2002. ISBN 80-7209-210-3.
- [28] EDWARDS, Michael. *Červené víno*. Praha: Slovart, 2001. Průvodce pro znalce. ISBN 80-7209-211-1.
- [29] LANGSTAFF, S. A. *Sensory quality control in the wine industry*, Applied Sensory. USA: LLC, 2010.
- [30] WOLLAN, David, Duc-Truc PHAM a Kerry Leigh WILKINSON. Changes in Wine Ethanol Content Due to Evaporation from Wine Glasses and Implications for Sensory Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2016, 64(40), 7569-7575 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b02691. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.6b02691>
- [31] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.

- [32] Compendium of International *Methods of Analysis of Wines and Musts Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts (2 vol.)* [online]. Paris, France: International Organisation of Vine and Wine, 2018 [cit. 2019-04-16]. Dostupné z: <http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/methods-of-analysis/compendium-of-international-methods-of-analysis-of-wines-and-musts-2-vol>
- [33] CHRISTENSEN, Jakob, Lars NØRGAARD, Rasmus BRO a Søren Balling ENGELSEN. Multivariate Autofluorescence of Intact Food Systems. *Chemical Reviews* [online]. 2006, 106(6), 1979-1994 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.1021/cr050019q. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr050019q>
- [34] GÜNZLER, Helmut a Alex WILLIAMS. *Handbook of Analytical Techniques*. 1. Weinheim Germany: WILEY-VCH, 2008. ISBN 3-527-30165-8
- [35] PAVLÍK, Dušan. *Měření spektrálních charakteristik fluorescenčních napětově-citlivých barviv* [online]. Brno, 2009 [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=15609. Bakalářská. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství, vedoucí práce Prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
- [36] DUFOUR, É., A. LETORT, A. LAGUET, A. LEBECQUE a J.N. SERRA. Investigation of variety, typicality and vintage of French and German wines using front-face fluorescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2006, 563(1-2), 292-299 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.1016/j.aca.2005.11.005. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267005018623>
- [37] KOTÁSKOVÁ, Eva. Stanovení polyfenolů, flavonoidů a studie antioxidační aktivity u směsí mouk miličky habešské. Zlín, 2014. Diplomová. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Ing. Daniela Sumczynski, Ph.D.
- [38] CZAPLICKI, Sylwester. *Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds*. MARTIN, Dean, ed. *Column Chromatography* [online]. InTech, 2013, 2013-04-11 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.5772/55620. ISBN 978-953-51-1074-3. Dostupné

- z: <http://www.intechopen.com/books/column-chromatography/chromatography-in-bioactivity-analysis-of-compounds>
- [39] MCMURRY, John. Organická chemie. Přeložil Jan BUDKA, přeložil Radek CIBULKA, přeložil Dalimil DVOŘÁK, přeložil Jaroslav KVÍČALA, přeložil Pavel LHOTÁK, přeložil Jiří SVOBODA. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2015. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-7080-930-3.
- [40] Spectrophotometry. <https://chem.libretexts.org> [online]. California: The California State University, 2019, May 3, 209 [cit. 2019-05-13]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry)
- [41] TUBARO, Franco, Roberto PIZZUTO, Gennaro RAIMO a Gianluca PAVENTI. A Novel Fluorimetric Method to Evaluate Red Wine Antioxidant Activity. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering* [online]. 2018, 63(1), 57-64 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.3311/PPch.12192. ISSN 1587-3765. Dostupné z: <https://pp.bme.hu/ch/article/view/12192>
- [42] SINGLETON, Vernon L., Rudolf ORTHOFER a Rosa M. LAMUELA-RAVENTÓS. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants Part A* [online]. Elsevier, 1999, 1999, s. 152-178 [cit. 2019-04-23]. *Methods in Enzymology*. DOI: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1. ISBN 9780121822002. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687999990171>
- [43] EVERETTE, Jace D., Quinton M. BRYANT, Ashlee M. GREEN, Yvonne A. ABBEY, Grant W. WANGILA a Richard B. WALKER. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin–Ciocalteu Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, 58(14), 8139-8144 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.1021/jf1005935. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf1005935>
- [44] PRIOR, Ronald L., Xianli WU a Karen SCHAICH. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary

- Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, 53(10), 4290-4302 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1021/jf0502698. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0502698>
- [45] Vyhláška č. 254/2010 Sb. Vyhláška, kterou se stanoví seznam vinařských podoblastí, vinařských obcí a viničních tratí ve znění pozdějších předpisů
- [46] Víno Blatel. Víno Blatel [online]. Blatnice pod Svatým Antonínkem, 2019 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.vinoblattel.cz/>
- [47] Vinoportugal [online]. Zlín, 2019 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://vinoportugal.cz/>
- [50] BALÍK, Josef. *Vinařství: návody do laboratorních cvičení*. Vyd. 3., nezměn. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004. ISBN 80-7157-933-5.
- [51] DUFOUR, É., A. LETORT, A. LAGUET, A. LEBECQUE a J.N. SERRA. Investigation of variety, typicality and vintage of French and German wines using front-face fluorescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2006, 563(1-2), 292-299 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.1016/j.aca.2005.11.005. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267005018623>
- [52] SÁDECKÁ, Jana, Michaela JAKUBÍKOVÁ a Pavel MÁJEK. Fluorescence spectroscopy for discrimination of botrytized wines. *Food Control*[online]. 2018, 88, 75-84 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.12.033. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713517306126>
- [53] Airado-Rodríguez, D., Duran-Merás, I., Galeano-Díaz, T., Wold, J. P. (2011). Front face fluorescence spectroscopy: A new tool for control in the wine industry. *Journal of Food Composition and Analysis*, sv. 24, str. 257-264.
- [54] Bravo, M. N., Silva, S., Coelho, A. V., Vilas Boas, L., Bronze, M. R. (2006). Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. *Analytica Chimica Acta*, sv. 563, str. 84-92.
- [55] Ma, T.-T., Sun, X.-Y., Gao, G.-T., Wang, X.-Y., Liu, X.-Y., Du, G.-R., Zhan, J.-C. (2014). Phenolic characterisation and antioxidant capacity of young wines ma-

- de from different grape varieties grown in Helanshan Donglu wine zone (China). *South African Journal for Enology & Viticulture*, sv. 35, str. 321-331.
- [56] Pour Nikfardjam, M. S., László, G., Dietrich, H. (2003). Polyphenols and antioxidative capacity in Hungarian Tokaj wine. *Mitteilungen Klosterneuburg*, sv. 53, str. 159-165.
- [57] ALEIXANDRE-TUDO, Jose Luis, Helene NIEUWOUDT, Alejandro OLIVIERI, Jose Luis ALEIXANDRE a Wessel DU TOIT. Phenolic profiling of grapes, fermenting samples and wines using UV-Visible spectroscopy with chemometrics. *Food Control* [online]. 2018, 85, 11-22 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.09.014. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713517304498>
- [59] *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, vol. 11, 2017, no. 1, p. 216-222, doi: <https://dx.doi.org/10.5219/727>
- [60] MARTIN, Coralie, Jean-Luc BRUNEEL, Frédéric CASTET, Alain FRITSCH, Pierre-Louis TEISSEDRE, Michael JOURDES a François GUILLAUME. Spectroscopic and theoretical investigations of phenolic acids in white wines. *Food Chemistry* [online]. 2017, 221, 568-575 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.11.137. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616319860>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|-------|--|
| ÚKZÚZ | Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský |
| SZPI | Státní zemědělská a potravinářská inspekce |
| VOC | Víno originální certifikace |
| °NM | Stupeň normalizovaného moštoměru |
| ASVK | Aktivní suché vinné kvasinky |
| BOK | Biologické odbourávání kyselin |
| JMF | Jablečno-mléčná fermentace |
| JMK | Jablečno-mléčné kvašení |
| HPLC | Vysokoučinná kapalinová chromatografie |
| DAD | Detektor diodového pole |
| FC | Folin-Ciocalteu |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|--|----|
| <i>Obr. 1: Polyfenolické antioxidanty [15]</i> | 16 |
| <i>Obr. 2: Diagram výroby bílých a červených vín (převzato od Balík a Stávek[1])</i> | 19 |
| <i>Obr. 3 Růstová křivka kvasinek [21]</i> | 22 |
| <i>Obr. 4: Jablonského diagram – schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly [35]</i> | 31 |
| <i>Obr. 5: Chemická struktura některých polyfenolů obsažených ve vínech [36]</i> | 32 |
| <i>Obr. 6: Schématický diagram vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)[38]</i> | 33 |
| <i>Obr. 7: Schéma uspořádání spektrofotometru[40]</i> | 35 |
| <i>Obr. 8: Kalibrační křivka kyseliny gallové</i> | 46 |
| <i>Obr. 9: Kalibrační křivka kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové</i> | 46 |
| <i>Obr. 10: Kalibrační křivka kyseliny 4-hydroxybenzoové</i> | 47 |
| <i>Obr. 11: Kalibrační křivka epigallokatechinu</i> | 47 |
| <i>Obr. 12: Kalibrační křivka epikatechinu</i> | 47 |
| <i>Obr. 13: Kalibrační křivka t-2-hydroxyskořicové kyseliny</i> | 48 |
| <i>Obr. 14: Závislost absorbance na vlnové délce (Veltlínské zelené, Petrov, 2017)</i> | 50 |
| <i>Obr. 15: Závislost absorbance na vlnové délce (Ryzlink vlašský, Petrov, 2017)</i> | 51 |
| <i>Obr. 16: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci polyfenolů</i> | 52 |
| <i>Obr. 17: Veltlínské zelené (2017), Skalica (excitace 270–282 nm, emise 350–380 nm)</i> | 55 |
| <i>Obr. 18: Gruner veltliner, 2017, Rakousko, (excitace 266–284, emise 378 nm)</i> | 56 |
| <i>Obr. 19: Merlot, 2015, Blatnice, (excitace 266–284 nm, emise 378 nm)</i> | 56 |

SEZNAM TABULEK

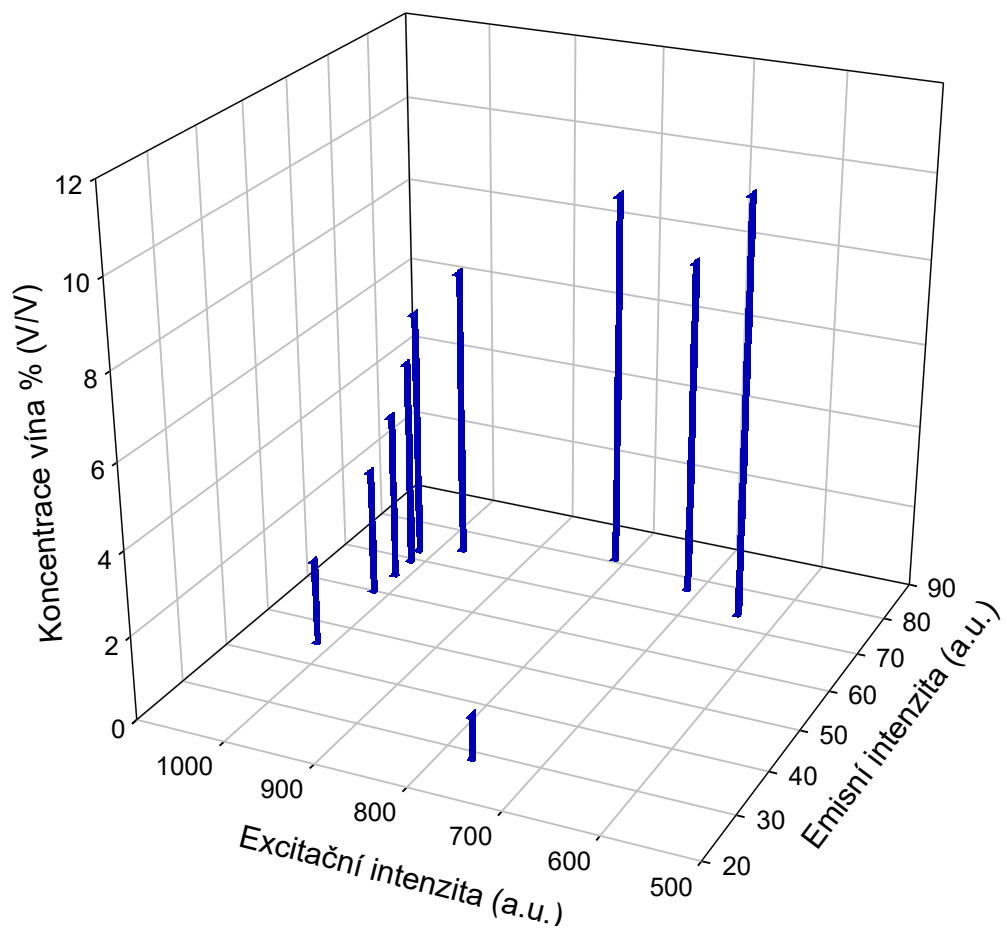
| | |
|---|----|
| <i>Tab. 1: Obsah některých těkavých látek ve víně [1]</i> | 12 |
| <i>Tab. 2: Obsah některých netěkavých extraktivních látek ve víně [1]</i> | 14 |
| <i>Tab. 3: Tichá vína z ČR, SK a Rakouska (sestupně)[45,46,47]</i> | 40 |
| <i>Tab. 4: Gradientová eluce</i> | 42 |
| <i>Tab. 5: Intenzita fluorescenčního záření pro vína z ČR, Slovenska a Rakouska excitace/emise – 260/350 nm a excitace/emise 300/495 nm</i> | 45 |
| <i>Tab. 6: Výsledky stanovení vybraných polyfenolických kyselin metodou HPLC</i> | 49 |
| <i>Tab. 7: Koncentrace polyfenolických látek ve vybraných vzorcích vína</i> | 52 |
| <i>Tab. 8: Výsledky stanovení hustoty vína pyknometricky</i> | 53 |
| <i>Tab. 9: Tab. 1. Příklad výsledků metody ANOVA pro posouzení obsahu polyfenolů v testovaných vzorcích Veltlínského zeleného a Ryzlinku vlašského</i> | 60 |
| <i>Tab. 10: Příklad výsledků metody ANOVA pro posouzení hustoty všech testovaných vín z moravské a malokarpatské oblasti (použita data pyknometricky stanovené hustoty)</i> | 60 |

SEZNAM PŘÍLOH

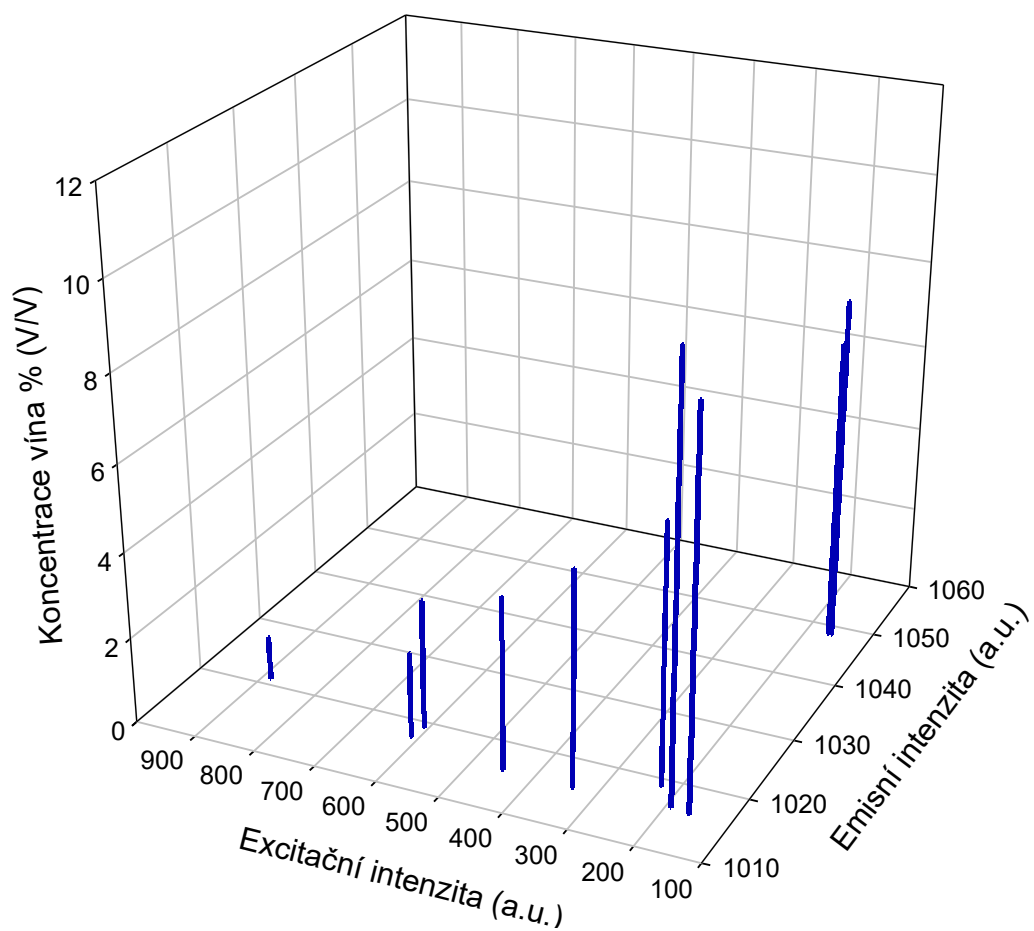
Příloha P I: Excitačně-emisní spektra vína v závislosti na koncentraci měřeného vína - fluorescenční spektroskopie

**PŘÍLOHA P I: EXCITAČNĚ-EMISNÍ SPEKTRA VÍNA
V ZÁVISLOSTI NA KONCENTRACI MĚŘENÉHO VÍNA –
FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE**

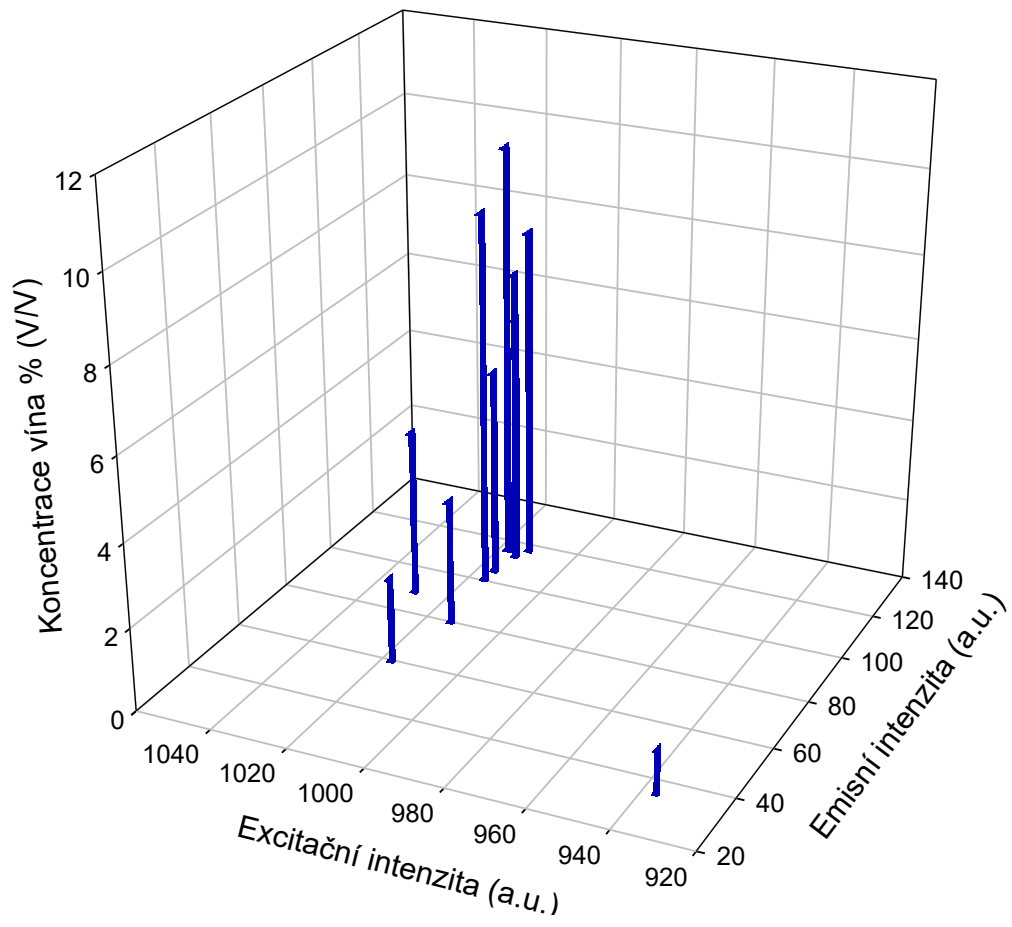
Veltlínské zelené (2017), Petrov (excitace 270-280 nm, emise 350-380 nm)



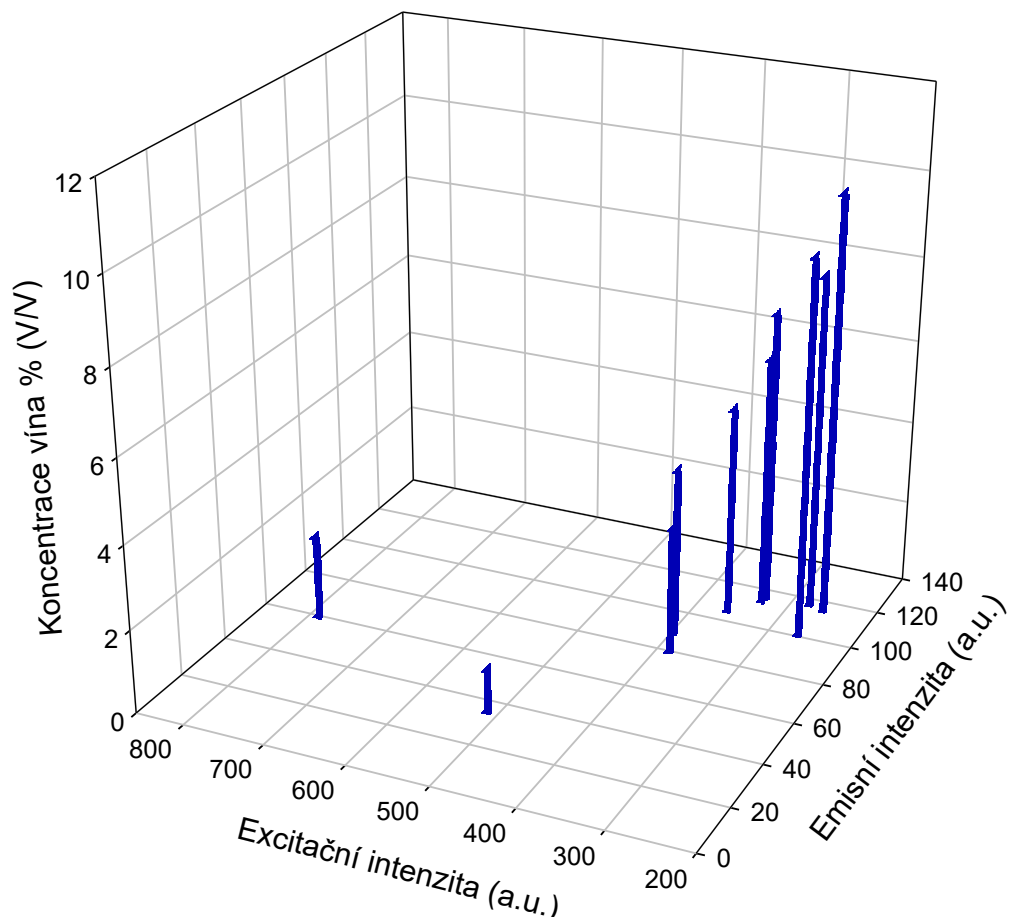
Veltlínské zelené (2017), Petrov (excitace 301-302 nm, emise 500-505 nm)



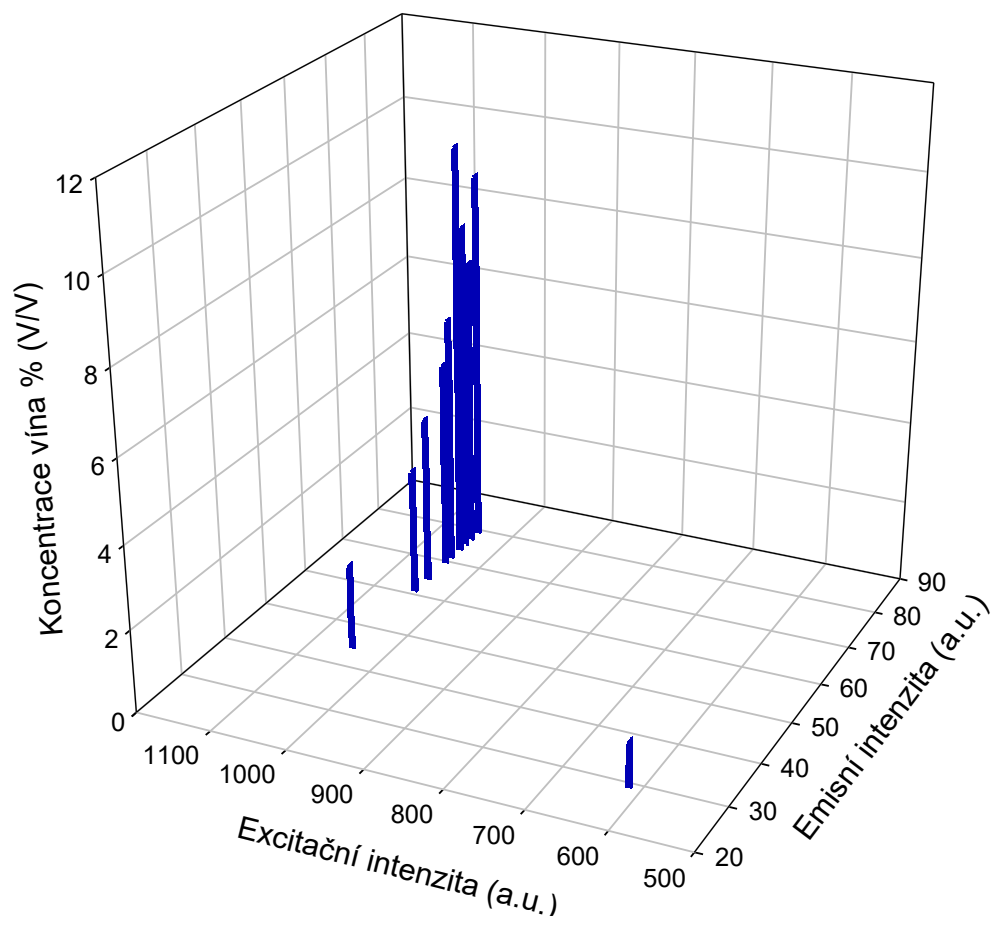
Ryzlink vlašský (2017), Petrov (excitace 270-285 nm, emise 350-380 nm)



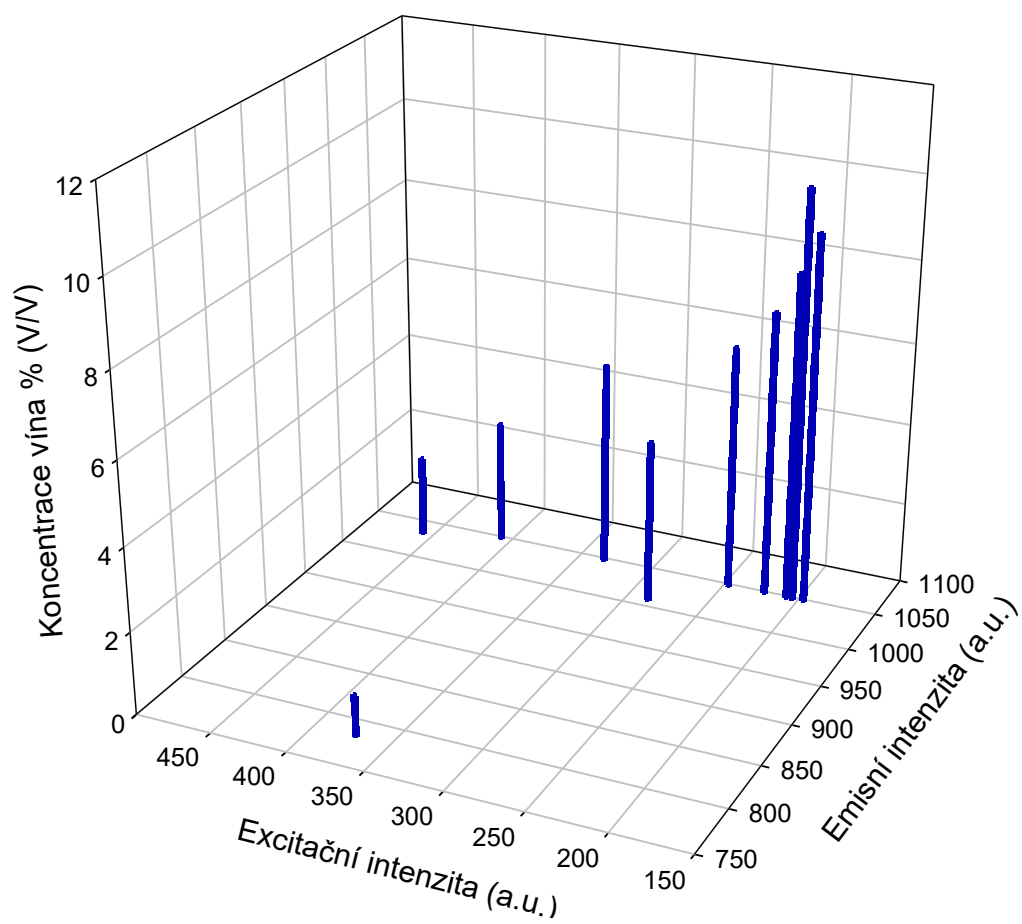
Ryzlink vlašský (2017), Petrov (excitace 301-305 nm, emise 350-380 nm)



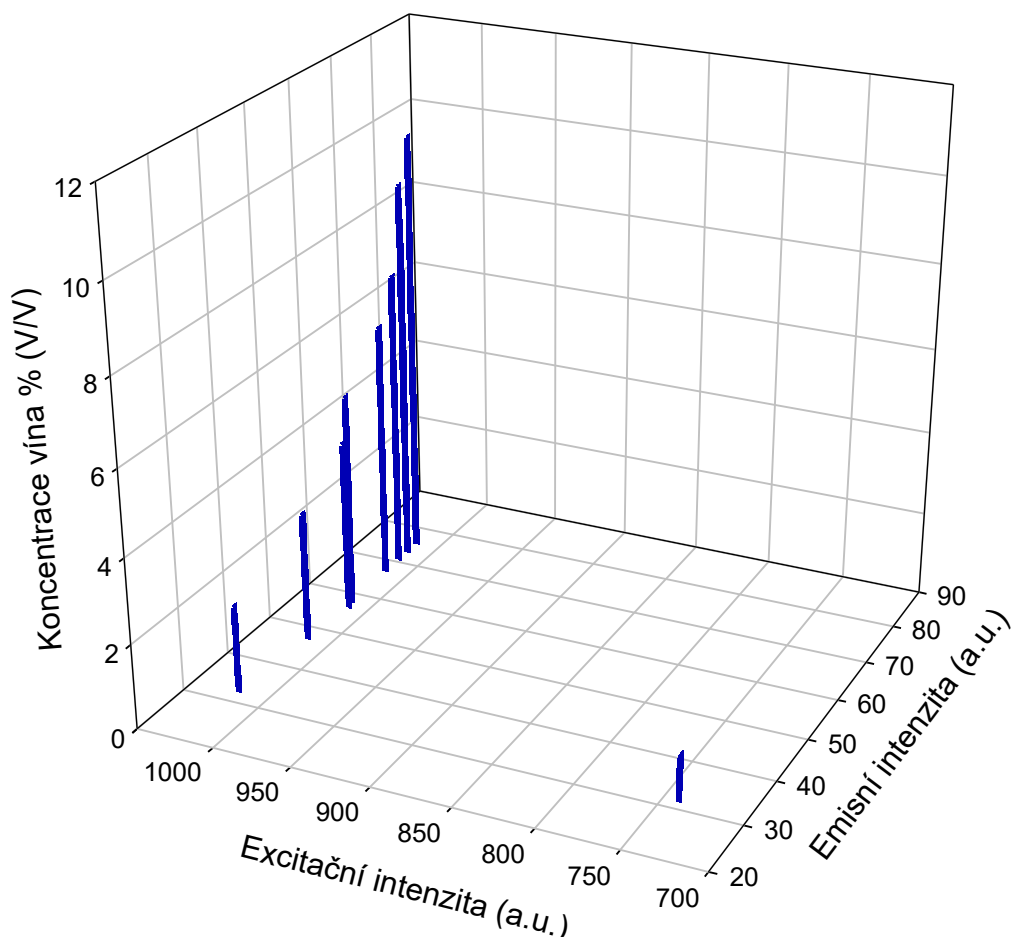
Vetlínské zelené (2017), Skalica (excitace 270-282 nm, emise 350-380 nm)



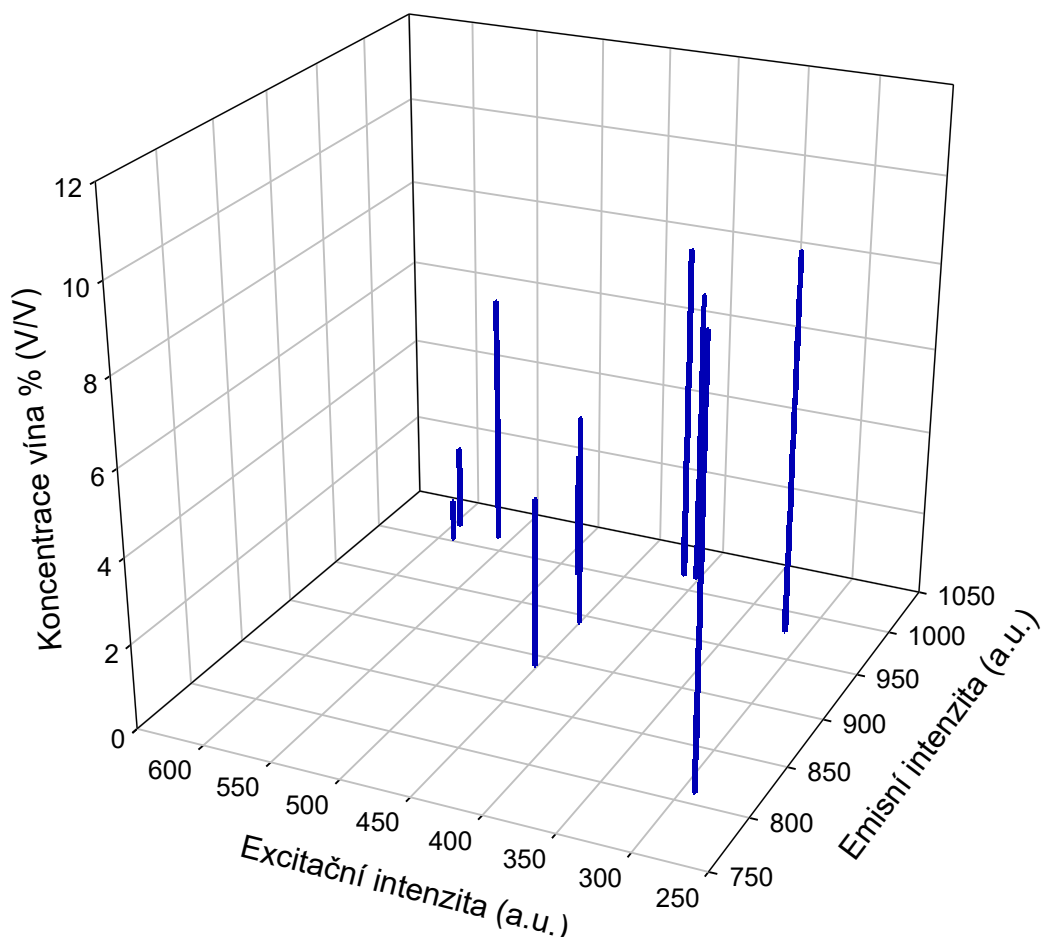
Vetlínské zelené (2017), Skalica (excitace 301-302 nm, emise 500-505 nm)



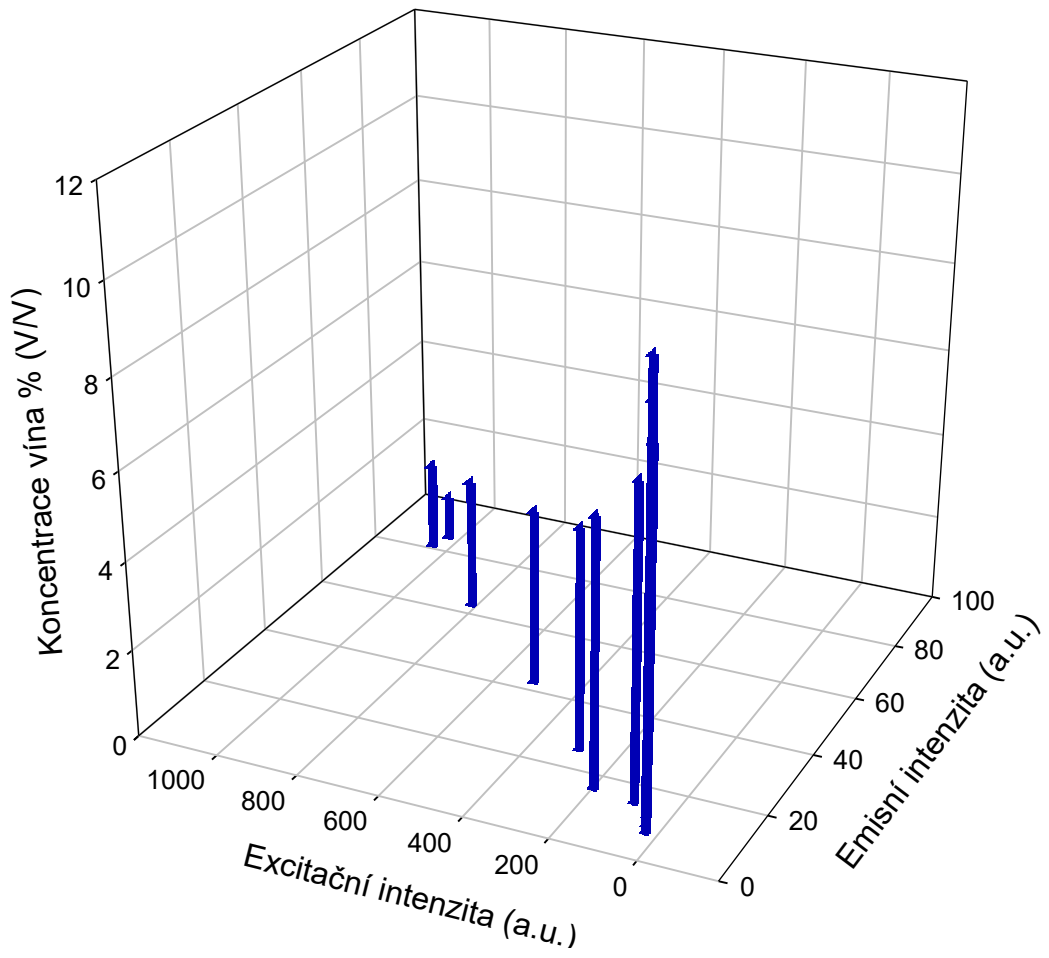
Ryzlink vlašský (2017), Skalica (excitace 270-285 nm, emise 350-380 nm)



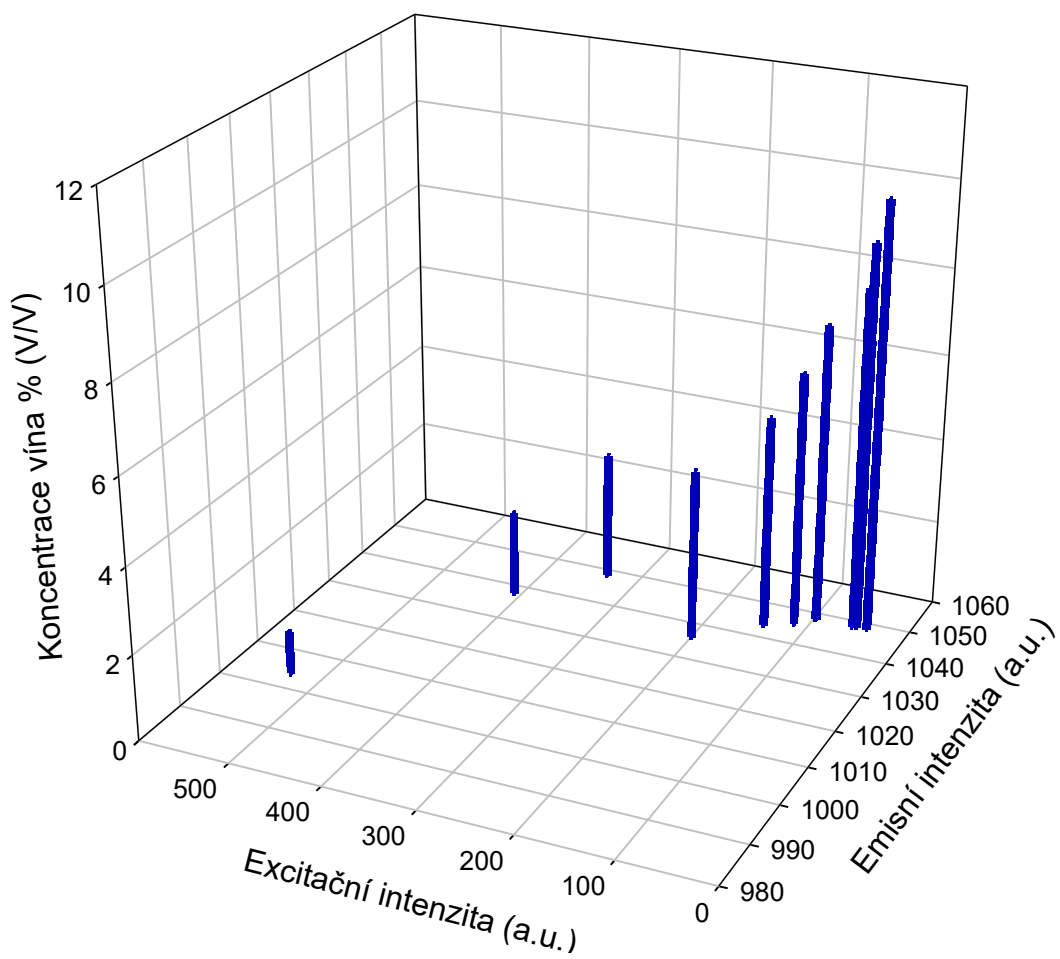
Ryzlink vlašský (2017), Skalica (excitace 301-305 nm, emise 495-505 nm)



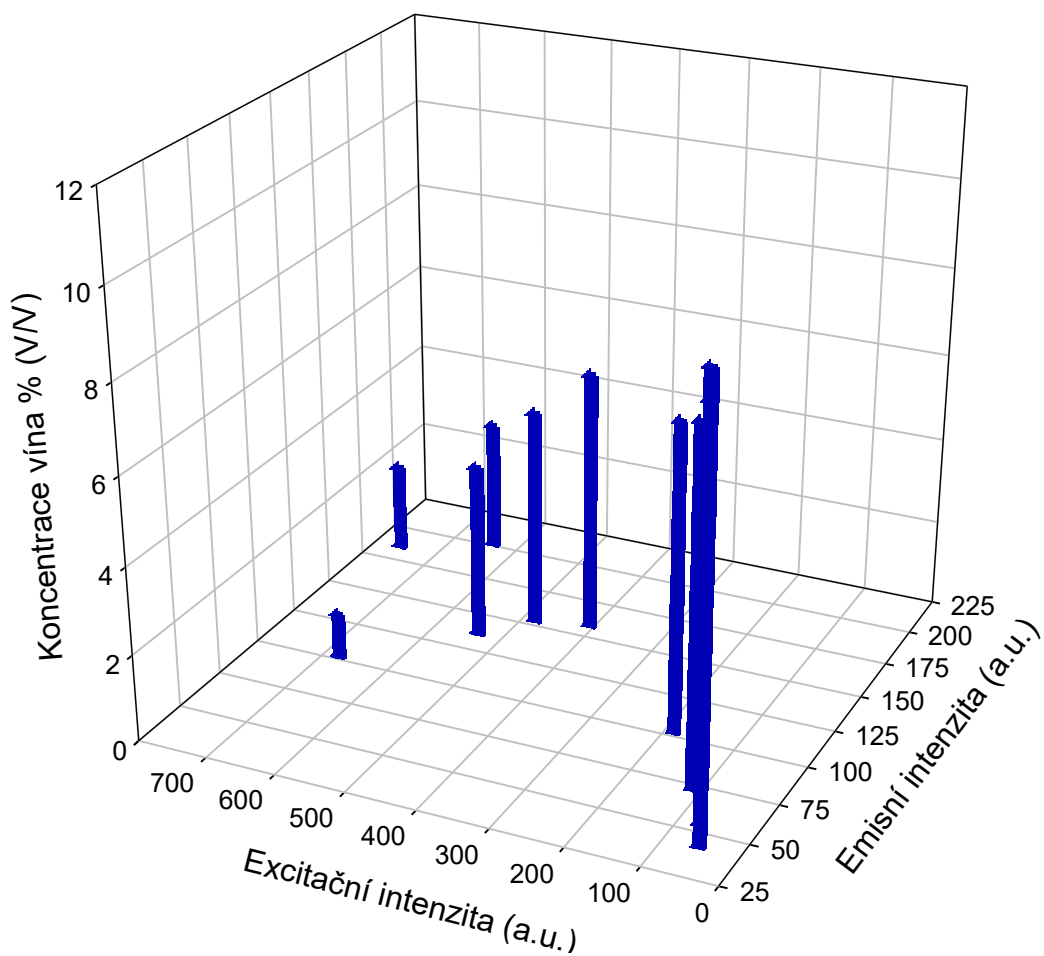
Merlot (2015), Blatnice (excitace 266-284 nm, emise 378 nm)



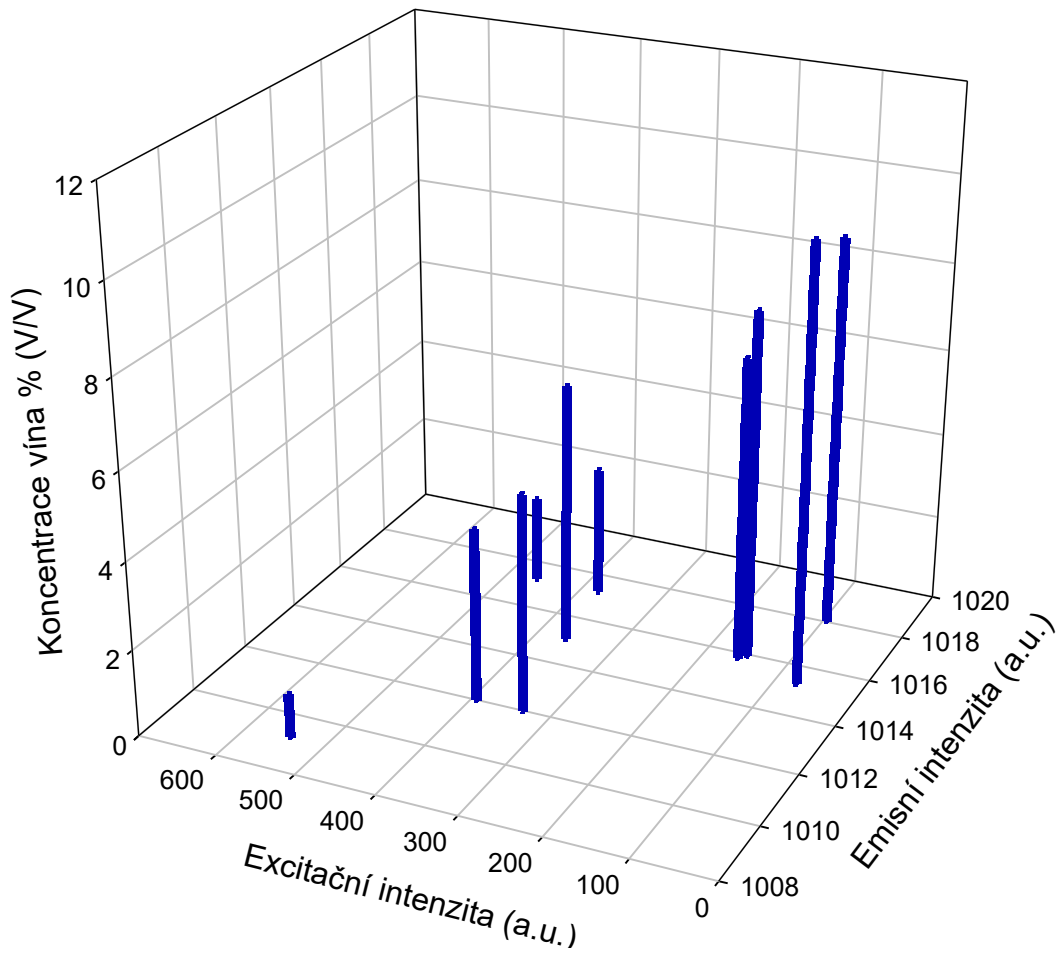
Merlot (2015), Blatnice (excitace 300-302 nm, emise 496-502 nm)



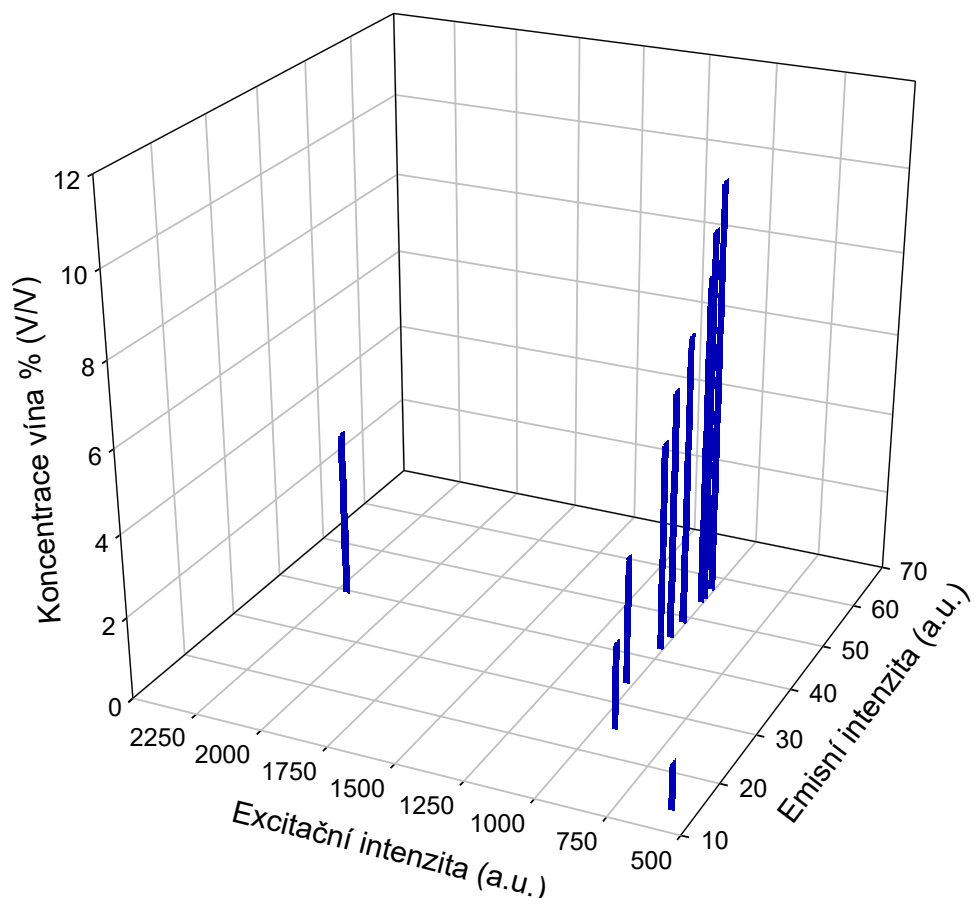
Merlot (2015), Skalica (excitace 266-284 nm, emise 378 nm)



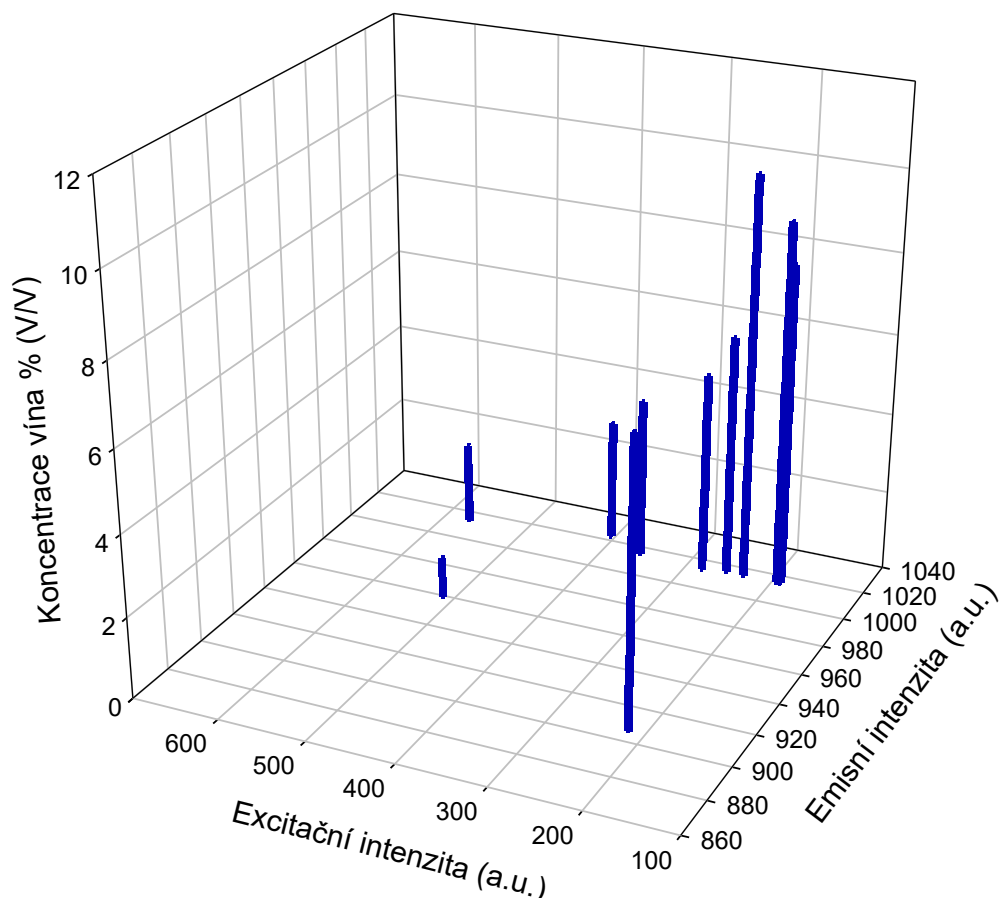
Merlot (2015), Skalica (excitace 300-302 nm, emise 496-502 nm)



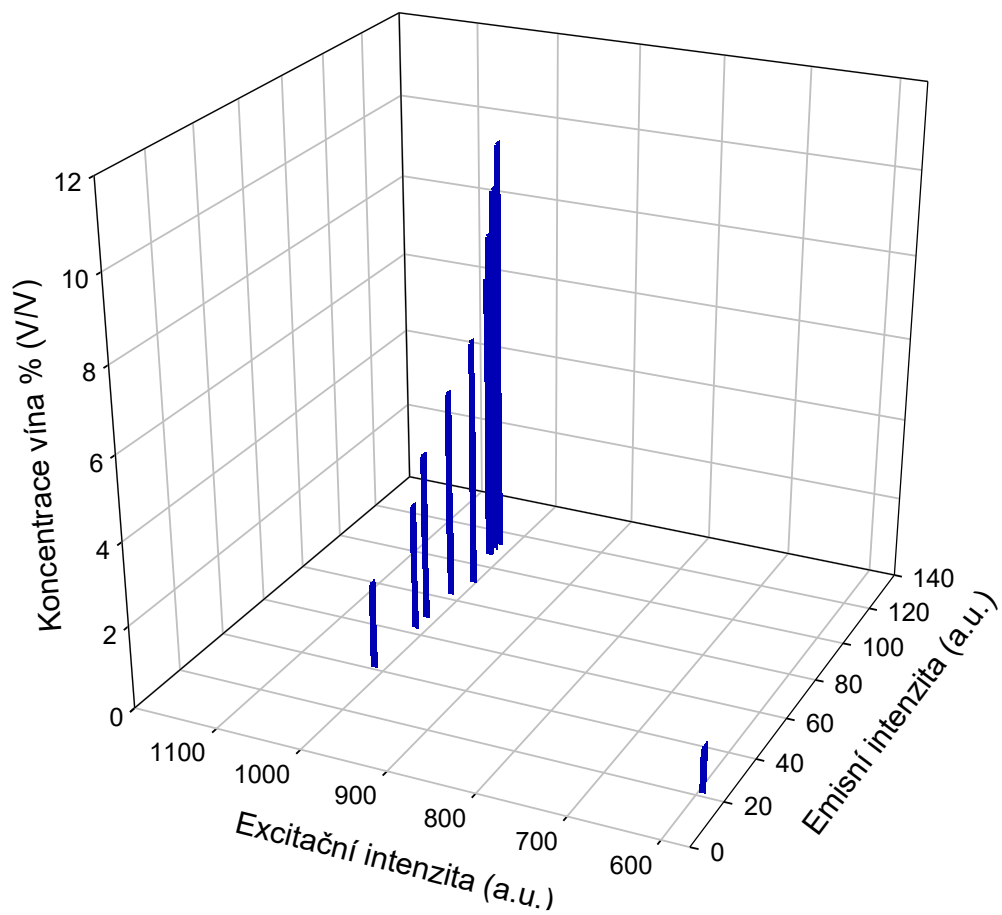
Grüner Veltliner (2017), Rakousko (excitace 270-280 nm, emise 350-380 nm)



Grüner Veltliner (2017), Rakousko (excitace 301-302 nm, emise 500-505 nm)



Welschriesling (2017), Rakousko (excitace 270-285 nm, emise 350-380 nm)



Welschriesling (2017), Rakousko (excitace 301-305 nm, emise 495-505 nm)

