

Použití vysoce účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickým detektorem pro stanovení vybraných organických kyselin ve víně

Bc. Kateřina Raková

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina RAKOVÁ**
Osobní číslo: **T08876**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Použití vysoce účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickým detektorem pro stanovení vybraných organických kyselin ve víně**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizace jednotlivých organických kyselin.
2. Technologie výroby vína.
3. Popis HPLC.

II. Praktická část

1. Metodika stanovení organických kyselin.
2. Stanovení organických kyselin ve vybraných vzorcích vína.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*, OSSIS, Tábor 1999.
- [2] MATO, I. et al. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines, *Food research international*, 2004, 38, 1175-1188.
- [3] ZEPPA, G. et al. Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2001, 49, 2722-2726
- [4] POSPÍŠILOVÁ, D. *Ampelografia*, 1. vydání, PRÍRODA, Bratislava 1981.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Pavel Hanuštiak

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

4. ledna 2010

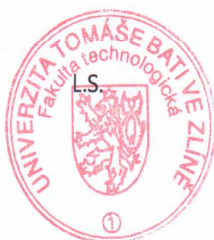
Termín odevzdání diplomové práce:

19. května 2010

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan




prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

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;
- byl/a jsem seznámen/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 užít 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, považují 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 nahlížení 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, opisy 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, užije-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).

³⁾ 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 užít 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 přihlédne k vyšší výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Předmětem diplomové práce bylo stanovení kyseliny vinné, citronové, jablečné, mléčné, octové a jantarové ve vzorcích vín, pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie. Teoretická část práce se zabývá technologií výroby vína, významem výše zmíněných organických kyselin ve víně a popisem chromatografické metody HPLC s elektrochemickým detektorem. V praktické části je uvedena metodika stanovení organických kyselin ve vzorcích vín za využití chromatografické metody HPLC.

Klíčová slova: víno, kyselina vinná, kyselina jablečná, kyselina citronová, kyselina mléčná, kyselina octová, kyselina jantarová, HPLC

ABSTRACT

The main object of this diploma thesis was to determine of tartaric, citric, malic, lactic, acetic and succinic acid in wine samples by high performance liquid chromatography. The theoretical part deals with the technology of wine production, the importance of the aforementioned organic acid in wine and description of chromatographic HPLC method with electrochemical detection. The experimental part describes the methodology for the determination of organic acids in wine samples using a chromatographic HPLC method.

Keywords: wine, tartaric acid, malic acid, citric acid, lactic acid, acetic acid, succinic acid, HPLC

Tímto chci poděkovat vedoucímu své diplomové práce panu Ing. Pavlu Hanuštiakovi, za odborné vedení, rady, připomínky a všechny zodpovězené dotazy týkající se dané problematiky. Dále chci poděkovat svým rodičům a blízkým za psychickou a finanční podporu při studiu.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 HISTORIE A CHARAKTERISTIKA RÉVY VINNÉ	13
1.1 HISTORIE VINAŘSTVÍ U NÁS	13
1.2 CHARAKTERISTIKA RÉVY VINNÉ.....	15
1.2.1 Odrůdy révy vinné.....	16
1.2.1.1 Odrůdy na výrobu bílých vín	16
1.2.1.2 Odrůdy na výrobu červených vín	17
1.2.1.3 Odrůdy na výrobu tokajských vín a odrůdy vín stolních	17
1.3 MORFOLOGICKÁ STAVBA RÉVY VINNÉ.....	17
1.4 CHEMICKÉ SLOŽENÍ HROZNŮ	19
1.4.1 Cukry	21
1.4.2 Minerální látky	22
1.4.3 Fenolické látky	22
1.4.4 Aromatické látky	23
1.4.5 Dusíkaté látky.....	23
1.4.6 Enzymy.....	23
1.4.7 Organické kyseliny.....	24
1.4.7.1 Nižší mastné kyseliny	25
1.4.7.2 Alifatické dikarboxylové a trikarboxylové kyseliny.....	26
1.4.7.3 Alifatické hydroxykyseliny	27
2 ROZDĚLENÍ VINAŘSKÝCH OBLASTÍ	34
2.1 ČESKÝ VINAŘSKÝ REGION	35
2.1.1 Vinařská podoblast litoměřická.....	35
2.1.2 Vinařská podoblast mělnická	36
2.2 MORAVSKÝ VINAŘSKÝ REGION	36
2.2.1 Vinařská podoblast mikulovská	37
2.2.2 Vinařská podoblast slovácká.....	38
2.2.3 Vinařská podoblast velkopavlovická	38
2.2.4 Vinařská podoblast znojemská.....	39
3 TECHNOLOGIE VÝROBY VÍNA	40
3.1 PŘEJÍMKA HROZNŮ	41
3.2 DRCENÍ HROZNŮ A PŘÍPRAVA RMUTU	41
3.3 LISOVÁNÍ RMUTU	42
3.4 ODKALENÍ MOŠTU	43
3.5 ÚPRAVA MOŠTU PRO KVAŠENÍ.....	43
3.5.1 Úprava kyselin v moštu	43
3.5.2 Úprava cukernatosti.....	44
3.5.3 Síření moštu	44

3.6	KVAŠENÍ MOŠTU.....	45
3.7	ŠKOLENÍ A OŠETŘOVÁNÍ RÉVOVÉHO VÍNA	46
3.8	LAHVOVÁNÍ VÍNA.....	48
4	CHROMATOGRRAFIE	49
4.1	HISTORIE CHROMATOGRRAFIE	49
4.2	ROZDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD	50
4.2.1	Podle skupenství mobilní fáze	50
4.2.2	Podle uspořádání fází	50
4.2.3	Podle probíhajícího děje.....	50
4.3	VYSOCE ÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE – HPLC	51
4.3.1	Čerpadla	52
4.3.2	Směšovací zařízení.....	52
4.3.3	Dávkovací zařízení.....	53
4.3.4	Kolony	53
4.3.5	Detektory	54
4.3.5.1	Fotometrické detektory	54
4.3.5.2	Refraktometrické detektory.....	55
4.3.5.3	Fluorimetrické detektory.....	56
4.3.5.4	Elektrochemické detektory	56
4.3.6	Vyhodnocovací zařízení.....	57
5	CÍL PRÁCE	58
II	PRAKTICKÁ ČÁST	59
6	MATERIÁL A METODIKA	60
6.1	ANALYZOVANÝ MATERIÁL	60
6.2	CHEMIKÁLIE	62
6.3	PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	62
6.4	STANOVENÍ STANDARDŮ ORGANICKÝCH KYSELIN – FIA DETEKCE.....	64
6.5	FIA DETEKCE A SKEN NAPĚTÍ	64
6.6	ZJIŠTĚNÍ RETENČNÍCH ČASŮ ORGANICKÝCH KYSELIN	64
6.7	VLIV KONCENTRACE ORGANICKÝCH KYSELIN NA ODEZVU DETEKTORU.....	64
6.8	ANALÝZA V PŘÍTOMNOSTI BIOLOGICKÉ MATRICE	64
6.8.1	Podmínky chromatografie pro samotnou analýzu.....	64
6.8.2	Příprava vzorků před destilací.....	65
6.8.3	Destilace vzorku.....	65
7	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	66

7.1	FIA DETEKCE STANDARDŮ ORGANICKÝCH KYSELIN	66
7.2	VLIV NAPĚTÍ NA ODEZVU DETEKTORU	66
7.3	ZJIŠTĚNÍ RETENČNÍCH ČASŮ KYSELIN	68
7.4	VLIV KONCENTRACE NA ODEZVU DETEKTORU	68
7.5	ANALÝZA V PŘÍTOMNOSTI BIOLOGICKÉ MATRICE	71
7.6	NÁVRATNOST A REPRODUKOVATELNOST STANOVENÍ ORGANICKÝCH KYSELIN.....	72
ZÁVĚR		73
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		74
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		82
SEZNAM OBRÁZKŮ		83
SEZNAM TABULEK.....		84
SEZNAM GRAFŮ		85
SEZNAM PŘÍLOH.....		86

ÚVOD

Vinařství je oddělení potravinářského průmyslu, kde se zpracovávají hrozny révy vinné na mošty, rmuty a vína. Toto odvětví je v ČR velmi tradiční a rozšířené, především ve 2 domácích vinařských oblastech. Víno je alkoholický nápoj, získaný úplným, nebo částečným alkoholickým zkvašením rmutu, nebo hroznového moštu, který náleží v ČR k nejčastěji prodávaným a konzumovaným produktům. Spotřeba vína se v posledních letech razantně zvyšuje, například od roku 2000 se zvedla spotřeba vína z 13,5 l/osoba/rok na hodnotu 16,3 l/osoba/rok v roce 2008.

Organické kyseliny jsou jednou z nejvýznamnějších látek vyskytující se v hroznové šťávě a ve víně. Na konzumenta působí svými organoleptickými vlastnostmi (barva, aroma) a zároveň zlepšují stabilitu a mikrobiologickou kvalitu vína. I v malých koncentracích mají velký vliv na technologické vlastnosti výrobků, ovlivňují průběh chemických a enzymových reakcí, mikrobiologickou stabilitu potravin během skladování a zpracování a to tím, že určují hodnotu pH potraviny. Kyseliny ovlivňují sensorický projev vyrobeného vína a zároveň mohou sloužit jako konzervační činidlo.

Metoda vysoce účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickým detektorem je moderní, sofistikovaný způsob separace organických sloučenin, který dokáže svými vlastnostmi konkurovat nebo převyšovat jiné podobné metody. Chromatografická separace zajišťuje velmi účinné rozdělení sloučenin na základě rozdílné absorpce složek vzorku, elektrochemický detektor dodává opakovatelnou, reprodukovatelnou a především velmi levnou variantu detekce.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 HISTORIE A CHARAKTERISTIKA RÉVY VINNÉ

Podle zákona 321/2004 Sb., o vinohradnictví a vinařství se jako víno označuje produkt, který byl získán úplným, nebo částečným alkoholovým zkvašením rmutu, nebo hroznového moštu z odrůd révy vinné, registrovaných ve Státní odrůdové knize [1]. Počátky výroby vína datujeme do doby, kdy se člověk začíná věnovat zemědělství, tedy do doby cca 10 000 let př. n. letopočtem. Ve starověkém Egyptě, před 5000 lety, byla výroba vína z hroznů téměř běžnou činností. O tom svědčí nálezy pozůstatků lisů na hrozny. V produkci pokračovali ve starověkém Řecku a Římě. Již tehdy se jako konzervační činidlo používala síra. Římské výboje rozšířily révu vinnou po celé Evropě a díky tomu se dostalo vinařství a vinohradnictví i na Moravu [2].

1.1 Historie vinařství u nás

9. století

Podle pověsti, moravský kníže Svatopluk zaslal knížeti Bořivojovi a jeho ženě Ludmile sud moravského vína k oslavě narození jejich syna Svyatopluka. Ludmila obětovala trochu vína bohyni Krosyně a poprosila ji o déšť, prosba byla vyslyšena a úroda byla zachráněna. Bořivoj a Ludmila se poté zasloužili o výsadbu prvních vinic v Čechách a v okolí Mělníka [3].

12. století

Rozvoj vinohradnictví je zajišťován pouze kláštery [4]. Cisterciáci z kláštera na Velehradě u Uherského Hradiště zakládají vinice u Hustopeče [3].

13. století

Z konce století pochází nejstarší text vinařského řádu a vinohradnického práva pro církevní majetky v okolí Kroměříže [4].

14. století

V Čechách i na Moravě zásluhou měšťanstva rostou rozlohy vinic. Zároveň narůstá import rakouských vín. Moravský markrabě Jan Jindřich vydal roku 1355 vzorový vinařský řád pro Moravu a městská rada v Brně vydala nařízení o povinnosti zápisu vinic do berních knih [4]. Císař Karel IV. vydává 9. 1. 1370 zákaz dovozu cizích vín do Čech a to v období od sv. Havla (16.10.) do sv. Jiří (24.4.). V té době se smí prodávat jen víno české [3].

15. století

Plochy vinic se zvětšují, vinice zakládají i méně majetní měšťané, kteří mají potřebné prostředky na založení vinice. Dochází k nárůstu falšování vína a proto král Vladislav II. Jagelonský nařizuje přísnou kontrolu škodlivých a falšovaných vín. Zahraniční vína na trhu začínají konkurovat domácím vínům [3, 4].

16. století

Rozloha vinic v Čechách i na Moravě kulminuje. Vína je přebytek, tlak dovážených vín se zvyšuje a úrody klesají [4]. Rakouští vinaři kolem roku 1539 požadují po Ferdinandu I., aby zakázal dovoz moravského vína do Rakouska [3].

17. a 18. století

V 17. století nastává třicetiletá válka, která má za následek úpadek vinařských ploch. Před válkou bylo v Čechách 3 336 ha vinic, po válce se tento stav snížil o 11 %. Koncem století se vinice pomalu obnovují [4].

19. století

Šlechta a měšťané začínají stavět pivovary a lihovary. Pití piva a kořalky potlačuje konzumaci vína [3]. Snižuje se různorodost odrůd révy vinné. Dnes v přírodě neexistuje rostoucí divoká réva a počet pěstovaných odrůd se silně zredukoval. Příčinou byla nákaza mšičkou révokazem, která v některých oblastech škodila až do roku 1930. Mšička révokaz ničí rostlinu od kořenů, výjimkou jsou pouze americké druhy *Rupestris*, *Riparia*, *Berlandieri*. V evropských vinicích se proto začaly jako podnože pěstovat americké keře a na ně se roubojí evropské odrůdy, jako jedna z nejlepších ochran proti tomuto škůdci [5].

20. a 21. století

V roce 1995 byl vydán zákon č. 115/1995 Sb., o vinohradnictví a vinařství a následně vznikla vyhláška ministerstva zemědělství ze dne 16. 8. 1995 č. 189/1995 Sb. [3]. S vývojem vinařské výroby se zvyšovala kvalita našich vín, která měla velkou konkurenci v dovážených zahraničních vínech [6]. Dochází k transformaci zemědělských závodů i vinařských podniků na menší akciové společnosti [7]. V České republice nastal v devadesátých letech značný obrat. Vinaři zvyšují kvalitu vína tím, že snižují objem sklizní a uplatňují moderní technologické postupy. Aby dosáhli vyšší kvality, vyrábějí vína s doloženým původem [8]. V roce 2004 byl vydán zákon č. 321/2004 Sb., o vinohradnictví

a vinařství a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o vinohradnictví a vinařství) ze dne 29. 4. 2004. Zákon upravuje správní přestupky, správní delikty, označování původu zboží, vinařství, víno, státní dozor [1]. Ve stejném roce byla vydána Vyhláška č. 323/2004 Sb., kterou se provádějí některé ustanovení zákona o vinařství a vinohradnictví. Vyhláška nabyla účinnosti 28. 5. 2004 [9].

1.2 Charakteristika révy vinné

Réva vinná je liánovitá rostlina, která má mohutný kořenový systém. Patří do čeledi *Vitaceae*, révovité [5]. Révovité rostliny podléhaly v období přirozeného vývoje přírodnímu výběru jedinců na četných stanovištích. Postupem času se vytvořilo několik druhů rodu *Vitis*, které byly adaptované na určité ekologické podmínky. Rod *Vitis* dělíme na dva podrody. Podrod *Muscadinia*, má dva druhy a tvoří přechod mezi rody *Vitis* a *Ampelopsis*. Jeden z jeho druhů, *Vitis rotundifolia*, pochází z jihovýchodní části USA a má vysoký stupeň odolnosti proti révokazu a houbovým chorobám. Odrůdy se obtížně rozmnožují řízkováním z důvodu špatné schopnosti zakořeňování. Podrod *Euvitis* má 70 druhů, které pochází ze tří oblastí. Největší počet je ze Severní Ameriky, menší počet pochází z Anglie a z Evropy pochází pouze jediný druh. Evropská réva, která se nazývá ušlechtilá réva, má botanický název *Vitis vinifera*. Tento druh (species) má dva poddruhy (subspecies). Jedním poddruhem je *Vitis vinifera* ssp. *silvestris*, která volně roste v lesích a její původ je na Blízkém východě. Jedná se o nejstarší a původní odrůdu dnešní vinné révy [10, 11]. Patří mezi divoce rostoucí révu v západní Asii a byla známa v celé jižní a střední Evropě [6]. Druhým poddruhem je *Vitis vinifera* ssp. *sativa*, která představuje velké množství pěstovaných odrůd neboli kultivarů révy vinné [10]. Pěstování révy vinné je závislé na řadě činitelů, především na klimatických podmínkách a odrůdové skladbě. Vinná réva není náročná na půdu, daří se jí téměř všude, s výjimkou půd mokrých, slaných a těžkých studených jílu. Kamenité půdy dávají vína jakostní, ale sklizeň bývá nižší. Velký význam má chemické složení půdy, jež ovlivňuje růst révy, ale také jakost. Nejlepší vína pocházejí z půd bohatých na fosfor a draslík [12]. Révovité rostliny jsou teplomilné. Vyznačují se vysokým tepelným prahem, což znamená, že začínají rašit při vysoké průměrné denní teplotě [10]. Révě *Vitis vinifera* se daří tam, kde teploty neklesají pod -20 °C, průměrné denní teploty jsou 18 - 25 °C a jarní teploty jsou 12 °C. Horní mez jejího pěstování je na severní polokouli na 20 ° až 50 ° s. š. a na jižní polokouli

30 ° až 50 ° j.š. Optimální podmínky pro vyzrání hroznů, především u modrých odrůd, jsou v oblastech, kde se nevyskytují jarní mrazy a kde je dostatek slunečního záření během roku. Velmi důležitý je teplý a dlouhý podzim, který pro dozrání hroznů vytváří optimální podmínky [6].

1.2.1 Odrůdy révy vinné

Identifikací jednotlivých druhů a rodů révy vinné se zabývá ampelografie (ampelos = řecky réva vinná) a graphe (popis) [13]. Ampelografové popsali několik tisíc odrůd révy vinné [12]. Odrůdy velkozrné se pěstují jako odrůdy stolní a odrůdy drobnozrné, se používají k výrobě hroznových moštů a hroznového vína [7].



Obrázek 1 – Rostlina révy vinné [14]

1.2.1.1 Odrůdy na výrobu bílých vín

Do této skupiny se řadí odrůdy, které dávají plná, extraktivní vína s charakterem typickým pro odrůdu, popřípadě s jemnými aromatickými nebo kořenitými látkami [10]. Zástupcem jsou Ryzlink rýnský, Tramín červený, Rulandské bílé, Sauvignon, Chardonnay, Veltlínské zelené [7]. V příloze I jsou pro názornost uvedeny obrázky některých odrůd vín.

1.2.1.2 Odrůdy na výrobu červených vín

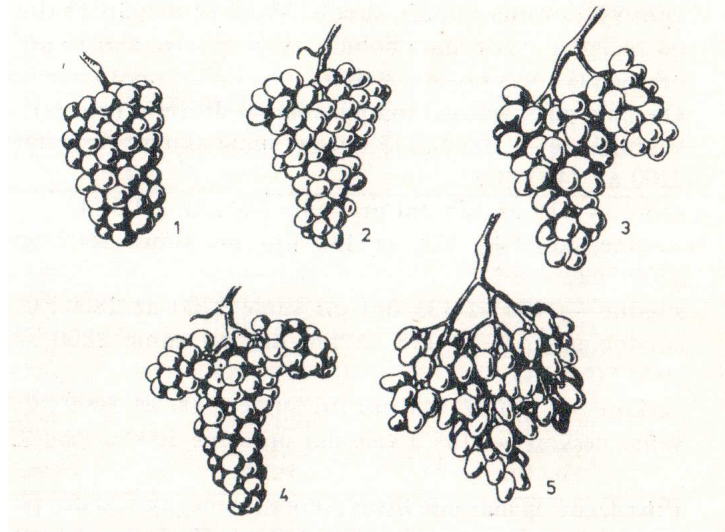
Sortiment pro výrobu jakostních červených vín v severních oblastech je značně omezen. Je to z důvodu, že v teplejších oblastech se v hroznech vytváří více barviva a tříslovin a zároveň dochází k poklesu kyselin, především kyseliny jablečné. Postupným oteplováním zemského ovzduší se začaly i u nás objevovat výsadby francouzských odrůd [10]. Do skupiny těchto odrůd se řadí Rulandské modré, Svatovavřínecké, Frankovka, Modrý Portugal, André, Zweigeltrebe [10, 12].

1.2.1.3 Odrůdy na výrobu tokajských vín a odrůdy vín stolních

Jako tokajská vína lze označovat pouze bílá vína, která se vyrábí ve vymezené části Maďarska a na Slovensku poblíž obcí Viniček a Malé Trni. Tato vína se smí vyrábět pouze z odrůd Furmint, Lipovina a Muškát žlutý. Některé odrůdy používané na výrobu moštů, je možné použít i jako odrůdy stolní, příkladem mohou být Chrupky, Olšava [15].

1.3 Morfologická stavba révy vinné

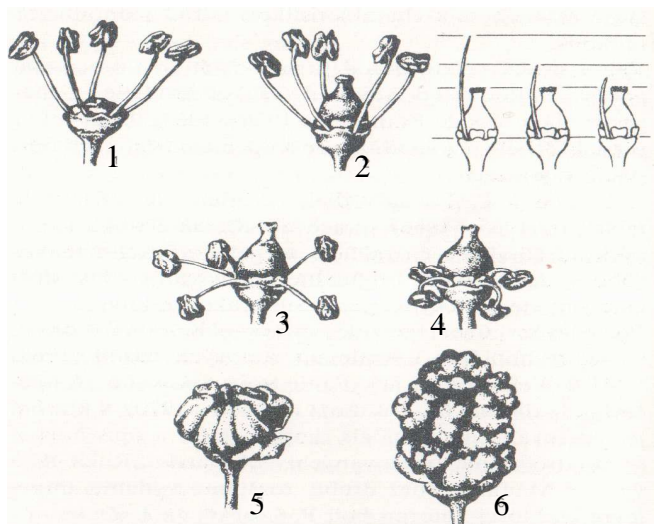
Hrozny se používají jako surovina na výrobu přírodních, perlivých a dezertních vín [16]. Hrozen révy vinné je složen z třapiny a bobule [5]. Podle velikosti rozlišujeme bobule malé (do 13 mm), střední (13 – 18 mm), velké (18 – 23 mm) a velmi velké (nad 23 mm). Existují bobule různých tvarů a barev. Tvary bobulí jsou uvedeny v příloze II. Bobule tvoří střípce, které jsou různé velikosti, hustoty a tvaru [17].



Obrázek 2 – Tvar střípců [17]

1 - cylindrický, 2 – cylindricko - kónický, 3 - kónický, 4 - kónický s ouškem, 5 - kónický křídlový, 6 – rozvětvený

Vnitřek bobule je tvořen dřeví s jádry a vnější dužinou. Mezi dřeví a slupkou je uloženo velké množství šťávy, která obsahuje velké množství cukru, kyselin a obsahuje také většinu stopových prvků [18]. Hmotnost bobulí bývá různá, hmotnost 100 ks bobulí se pohybuje v rozpětí 120 – 400 g. Bobule obsahují průměrně 1 – 2 pecičky, které obsahují značné množství oleje s výborným chemickým složením [4]. Dužina představuje až 90 % hmotnosti hroznu [16]. Dužina je z hlediska zpracování nevýznamnější součástí hroznu [5]. Vnější část dužiny je šťavnatější, vnitřní je tužší a má průměrně 8 % cévních svazků, které pronikají do ostatních částí dužiny a vyživují bobule [4]. Dužina u většiny hroznů je bezbarvá, pouze výjimečně může být narůžovělá až načervenalá a obsahuje sladkou šťávu [19]. Povrch slupky je pokryt voskem, který ji chrání před přílišným odparem vody, při dešti chrání bobule před rozmočením a před infekcí choroboplodnými mikroorganismy [5]. Slupka chrání dužinu po dobu, než dojde k jejímu dozrání [18]. Podíl slupky tvoří 9 – 11 % hmotnosti hroznu. Složení slupky je závislé na odrůdě a má vliv na barvu, vůni, chuť a charakter vína [5]. Listy révy vinné se dělí podle velikosti čepele na malé (méně než 0,12 m), střední (0,12 - 0,16 m), velké (0,16 - 0,20 m) a velmi velké (více než 0,20 m). Dále se u listů rozlišuje tvar čepele (válcovitý, okrouhlý). Květ révy vinné je tyčinkovitý, obojstranný a vyskytují se i různé morfologické a funkční anomálie [17]. Květ je schopen samoopylení v důsledku přítomnosti pestíků a tyčinek. Americké druhy révy vinné jsou jednopohlavní, a z toho důvodu potřebují k opylení pomoc hmyzu nebo větru [18].



Obrázek 3 – Typy květů [17]

1 - tyčinkovitý, 2 - obojpohlavní, 3,4 - pestíkovitý, 5,6 - morfologicky a funkčně anomální
 Třapina tvoří 3 – 4 % z hmotnosti hroznů. Před dosažením technologické zralosti je zelená, poté dřevnatí a hnědne. Ze zelené, nevyzrálé třapiny, se mohou do moštu vyluhovat třísloviny a chlorofyl, které poškozují sensorické vlastnosti vína [5]. Stolní hrozny mají velké třapiny s velkými bobulemi a pevnou slupkou, čímž se zlepšuje jejich skladovatelnost. Moštové hrozny mají třapiny s menšími bobulemi nahuštěnými na sobě a s tenčí slupkou, která umožňuje snazší vylisování. Třapina vykonává funkci vodivého pletiva mezi kořenem, listy a plody [4].

1.4 Chemické složení hroznů

Základem výroby kvalitního vína jsou vypěstované zdravé a kvalitní hrozny [20]. Víno je složitá směs několika set látek přítomných v různých koncentracích. Počet a množství metabolitů, včetně alkoholu, glycerolu, cukrů, organických kyselin, mají vliv na jakost vína [21]. Veškeré organické a anorganické látky, které určují kvalitu hroznů a vína, se soustřeďují v bobulích. Bobule se začíná vyvíjet po odkvětu révy vinné a to v první polovině června a dělí se do tří stádií [4].

1. fáze – trvá přibližně 35 – 55 dnů podle odrůdy a pěstitelských podmínek. V průběhu této fáze je bobule tvrdá a zelená, plody obsahují barvivo chlorofyl. Objem i hmotnost bobulí se zvětšuje, z vnějších buněk se vytváří slupka, z vnitřních dužina [4]. Převládá tvorba organických kyselin a prekurzorů fenolických a aromatických látek [2]. Hrozny obsahují nepatrné množství cukru,

protože asimiláty se koncentrují do růstových vrcholů, v nichž se spotřebovávají na tvorbu pletiv [20]. Obsah cukru nepřevyšuje 1 % a obsah kyselin dosahuje množství až 35 g/l [16].

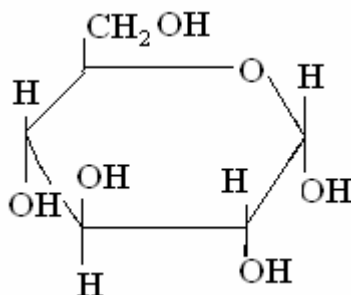
2. fáze – dochází k vybarvování a zaměkávání bobulí. Tím, že bobule zaměká, dochází k akumulaci cukrů, fenolických látek a aromatických látek v bobuli. Snižuje se obsah kyselin [2].
3. fáze – trvá od zaměkání bobulí do sklizně. Zvětšování bobulí závisí na příjmu vody ze srážek nebo ze závlahy, na ostatních klimatických činitelích a na metabolické aktivitě probíhající v bobulích [2]. Bobule se stávají průsvitnější, zvyšuje se obsah cukru, denní přírůstek na konci zrání může tvořit 0,5 – 1 % [20]. Buňky slupek modrých hroznů se zabarvují [4]. V počátečním období převládá glukóza, která se vyrovnává přírůstkem fruktózy. Množství kyseliny vinné a jablečné se postupně snižuje. Kyselina vinná se váže jako vinan draselný a kyselina jablečná se dýcháním oxiduje na CO₂ a vodu. V třapině se během zrání snižuje obsah škrobu, bílkovin, tříslovin i vody a třapina dřevnatí [20]. Nejdůležitějším zdrojem energie je dýchání, na začátku zrání je spotřeba kyslíku a tvorba CO₂ malá [16]. Průběh zrání bobule ovlivňují různé vlivy – počasí, odrůda révy, umístění vinice. Za suchého a teplého počasí se vlivem odpařování vody relativně zvyšuje cukernatost [4]. Zráním se zvyšuje obsah minerálních látek, převahu tvoří draslík. Zrání se projevuje také změnou barvy bobulí, kdy zelený chlorofyl postupně ubývá a bobule se zabarvují do žlutozelená nebo zlatožluta [16]. V období zrání často napadá bobule vláknitá houba *Botrytis cinerea*, která způsobuje za příznivého počasí ušlechtilou hnilobu a za vlhkého počasí zhoubnou hnilobu hroznů. Tato houba mění chemické složení šťávy a pro svoji výživu spotřebuje více kyselin než cukru. Původní vůně hroznů je pozměněna, vytváří se malé množství glycerolu, významné množství oxidovatelných enzymů a tvoří se látky, které ovlivňují kvasné pochody. Zhoubná hniloba způsobuje předčasné uhnutí bobule [4].

Tabulka 1 – Chemické složení jednotlivých částí hroznů (hm%) [4]

Složka	Třápina	Slupka	Pecičky	Dužina
voda	35-90	50-10	30-45	55-90
monosacharidy				
pentózy	1,0-2,8	1,2-1,2	3,9-4,5	0,2-0,5
hexózy (glukóza+fruktóza)	stopy	nízká koncentrace	0	
polysacharidy				
sacharóza	0	0	0	0-1,5
škrob	stopy	0	0	0
celulóza	0	3,5	0	stopy
pektinové a slizové látky	0,7	0,9	0	0,1-0,3
kyseliny	0,5-1,6	0,1-0,7	0	0,2-0,3
třísloviny	1,3-5,0	0,1-4,0	0,5-8,0	stopy
barviva	0		0	stopy
enzymy	stopy	nízká koncentrace	stopy	stopy
vitamíny	nízká koncentrace	nízká koncentrace	nízká koncentrace	stopy
dusíkaté látky	0,7-2,2	0,8-2,0	0,8-6,0	0,2-1,4
aromatické látky	0	stopy	stopy	0
olej	0	0,1-1,5	-	0
popol	-	0,5-3,7	-	0,1-1,0

1.4.1 Cukry

Nejvýznamnější cukry jsou obsaženy v bobulích révy vinné [2]. Cukry vznikají přirozeně fotosyntézou v zelených částech rostlin [6]. Ve vínech, které obsahují přirozený zbytkový cukr, převažuje fruktóza, která má sladivost 114 %, sladivost glukózy je 69 % [22]. Polarimetrií je možno zjistit, jaký cukr se v hroznech vyskytuje. Glukóza je cukr pravotočivý s aldehydickou funkční skupinou, zatímco fruktóza je levotočivý cukr s funkční skupinou ketonickou [8]. Po zaměkání má v bobulích větší zastoupení glukóza než fruktóza, ale v době zralosti a sklizně je poměr obou cukrů přibližně 1:1. Obsah cukrů určuje cukernatost hroznů, která je hlavním parametrem pro zatřídění vín do jakostních stupňů. Od ní se dále odvíjí obsah alkoholu ve víně [2].



Obrázek 4 – α -D-glukóza

1.4.2 Minerální látky

Jsou obsaženy v bobulích [5]. Podílí se na tvorbě chuťových vlastností a extraktu vína. Na jejich obsah ve víně má vliv především půda a její geologický původ a zároveň také počasí, které je v daném roce [2]. Převládá obsah dusíku, kterého v popelu vína nalezneme v množství kolem 50 %, a kyselina fosforečná. Červená vína obsahují minerálních látek více než vína bílá. Minerálie jsou důležité pro růst kvasinek [6]. Během dozrávání se obsah draslíku v hroznech zvyšuje ve vztahu k akumulaci cukrů. Draslík má funkci jako aktivátor enzymatických procesů [2].

1.4.3 Fenolické látky

Fenolické látky jsou důležité, jak z hlediska organoleptického, tak technologického. Vínu dodávají barvu a ovlivňují také jeho chuť, zvláště u vín červených. Polyfenoly mají schopnost srážet bílkoviny, konzervují víno a zúčastňují se čiření vína. Flavonoidy obsahují řadu příbuzných sloučenin, patří sem anthokyany, což jsou červená barviva, která se nachází ve slupkách modrých odrůd nebo v dužině bobulí odrůd barvířek [8]. Anthokyany se z buněk uvolňují až po předchozím umrtvení alkoholem, teplem nebo atmosférou CO_2 [5]. Fenolické látky u odrůd révy vinné nalezneme v třapině, dužině, ve slupce bobulí a také v semenech. Obsah ovlivňují pěstelské podmínky, mezi které patří klimatické a půdní vlastnosti stanoviště. Neméně významnou skupinou fenolických látek jsou taniny, mezi ně se zařazuje katechin, epikatechin a jejich dimery, trimery. Nachází se hlavně ve slupkách a semenech a odpovídají za chuťové vlastnosti červených vín. Fenolické látky se vytváří rovněž u bílých vín, kde zodpovídají za hnědnutí moštu a vína [2].

1.4.4 Aromatické látky

Aromatické látky ve víně mohou být nejrůznějšího původu, může se jednat o látky jednoduché, jako kyseliny a estery nebo složitější, jako jsou terpenoly, které dodávají vínu kořenité či květinové vůně [8]. Jsou koncentrovány ve slupkách hroznů, z nichž se dají vyloučit krátkým kvašením po odzrnění hroznů [5]. Každá odrůda révy vinné se vyznačuje určitým charakterem aromatických i chuťových látek, jejichž intenzita stoupá s vyzráváním hroznů. Primární aromatické látky se mění jak během kvašení, tak během zrání a stárnutí v aromatické látky sekundární. Charakter těchto látek se může měnit činností ušlechtilé plísně *Botrytis cinerea* a negativně taky napadením hroznů plísněmi a bakteriemi [6]. Aromatické látky, které se nachází v bobulích, můžeme dělit podle jejich chemického složení na norisoprenoidy, které vznikají jako produkty při odbourávání karotenoidů a vyskytují se u odrůd Chardonnay, těkavé fenoly a monoterpeny (nachází se u odrůd Muškát Ottonel, Tramín, Ryzlink rýnský) [2].

1.4.5 Dusíkaté látky

Bobule jakostních hroznů obsahují více dusíkatých látek, než bobule hroznů odrůd méně jakostních. Původní obsah dusíkatých látek se při kvašení ve víně snižuje, protože slouží jako zdroj výživy pro kvasinky. Víno obsahuje přibližně dvacet aminokyselin, které se podílí na tvorbě aromatických i chuťových látek [6]. Celkové množství aminokyselin v bobulích závisí na mnoha faktorech okolního prostředí a současně na agrotechnice na vinici. V chladnějších oblastech se hromadí podstatně více aminokyselin než v teplejších oblastech. Za teplého a suchého počasí se vytváří v hroznech vyšší množství bílkovin, které mohou způsobit problémy během kvašení a ve víně se mohou vyskytovat ve větší míře bílkovinné zákaly [2].

1.4.6 Enzymy

Enzymy vyvolávají téměř všechny chemické pochody, které probíhají v bobulích. Každá reakce je vyvolána specifickým enzymem. Protopektináza rozkládá protopektin na pektiny, oxidáza způsobuje hnědnutí mladých vín atd. [6].

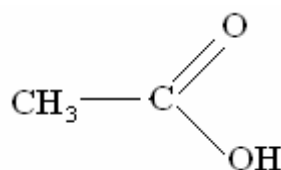
1.4.7 Organické kyseliny

Karboxylové kyseliny jsou významnými složkami některých potravin a to především produktů rostlinného původu [23]. Organické kyseliny, jako produkty a meziprodukty nejrůznějších metabolických drah, jsou produkovány v celém organismu člověka, a zároveň je vytváří i střevní mikroflóra. Jsou to tedy látky lidskému tělu přirozené [24]. Karboxylové kyseliny zauímají ústřední místo mezi karboxylovými sloučeninami. Nejen že jsou hodnotné samy o sobě, slouží jako výchozí materiál při přípravě acyl derivátů [25]. Organické kyseliny představují významný podíl v sušině moštu, vína a octu. Jejich původ je různý a mezi nejdůležitější patří biosyntéza z révy vinné, metabolické cesty související s kvašením cukru, jablečno – mléčné kvašení a oxidace ethanolu [26]. Stanovení množství organických kyselin je důležitou součástí během průběhu výroby vína. Rovnováha jednotlivých kyselin je důležitá a ovlivňuje chuť, barvu vína a musí být pozorně kontrolována kvůli správnému průběhu fermentace a zabránění znehodnocení [27]. Nízkomolekulární organické kyseliny jsou významnou skupinou látek vyskytující se v hroznové šťávě a ve víně. Na konzumenta působí svými organoleptickými vlastnostmi (barva, aroma) a zároveň zlepšují stabilitu a mikrobiologickou kvalitu vína [28]. I v malých koncentracích mají velký vliv na technologické vlastnosti výrobků, ovlivňují průběh chemických a enzymových reakcí, mikrobiologickou stabilitu potravin během skladování a zpracování a to tím, že určují hodnotu pH potraviny [23,29]. Koncentrace a složení kyselin v bobulích závisí na odrůdě a podmínkách okolního prostředí. Význam hraje především oslunění hroznů, které způsobují snižování obsahu kyseliny jablečné v bobulích. Kyseliny ovlivňují sensorický projev vyrobeného vína a zároveň mohou sloužit jako konzervační činidlo. U vín bílých je pozitivní vyšší obsah kyselin (5 - 9 g/l), protože podporuje svěžest chuti a zvyšuje aromatický projev vína. U modrých odrůd je žádoucí z chuťového pohledu nižší obsah kyseliny jablečné [2]. V potravinářství se především vyskytují karboxylové kyseliny alifatické, alicyklické, aromatické nebo heterocyklické. Jako vonné a chuťové látky se uplatňují nižší mastné kyseliny a některé aromatické kyseliny. Největší význam jako chuťové látky mají vícesytné karboxylové kyseliny, z alifatických kyselin jsou to kyselina octová a mléčná, které jsou významnými nositeli kyselé chuti potravin [29]. Mezi nejrozšířenější organické kyseliny patří kyselina jablečná, vinná a citronová, které se souhrnně nazývají ovocné kyseliny [30]. Obsah kyseliny v ovoci se udává v gramech na litr [31]. Tyto kyseliny byly nalezeny ve vinných hroznech

a označují se jako primární kyseliny. V průběhu výroby vína a ve zralém vínu může hrát významnou roli kyselina octová, máselná, mléčná a jantarová. Jako měřítko množství kyselin ve víně je označována titrační kyselost nebo celkový obsah kyselin, který udává celkový obsah všech přítomných kyselin. Síla kyselin se měří podle pH [32]. Síla kyseliny odpovídá tomu, co skutečně cítíme na jazyku, a proto se označuje jako „aktuální kyselost“ [31]. Většina vín má pH 2,9 - 3,9. Čím nižší pH, tím vyšší je obsah kyselin ve víně [32]. Titrační kyselost ve vinných hroznech se pohybuje v rozmezí 5 - 16 g/l [33]. Nedo zralé bobule mohou obsahovat až 8 g/l kyseliny vinné a kolem 14 g/l kyseliny jablečné, v přezralých hroznech se obsah kyseliny vinné snižuje na 4 - 6 g/l a kyseliny jablečné na 4 - 10 g/l. Ostatní kyseliny se nachází ve velmi malých množstvích, ale přesto se uplatňují jako významné látky pro tvorbu aromatických a chuťových látek. Kyselina citronová se ve vínech téměř nevyskytuje, její množství tvoří 0,02 - 0,3 %, protože dochází k jejímu rozložení během kvašení [6, 33].

1.4.7.1 Nižší mastné kyseliny

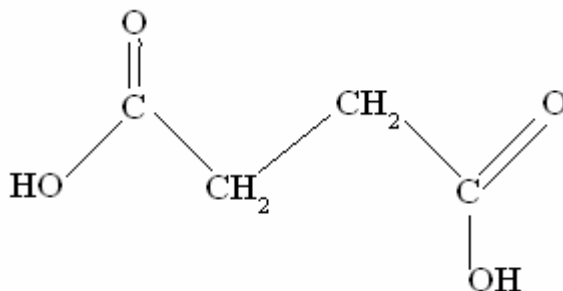
Nejběžnější monokarboxylovou kyselinou vyskytující se v potravinách je **kyselina octová**. Je pravidelnou součástí ovoce a potravin, při jejichž výrobě se uplatňují kvasné procesy, tedy kde vyvíjejí činnost mikroorganismy nebo kde působí přirozené enzymové systémy. Vzniká jako produkt degradace cukrů a jiných složek potravin při termických procesech. Pro potravinářské účely se vyrábí mikrobiální oxidací bakteriemi rodu *Acetobacter* z ethanolu, ovocných vín nebo moštů jako kvasný lihový nebo ovocný ocet [23, 29]. Kyselina je důležitá při výrobě esterů kyseliny octové, které mohou dát vínu ovocný charakter [34]. Je-li víno vystaveno kyslíku, tak bakterie konvertují ethanol na kyselinu octovou. Nadměrné množství je považováno za vadu vína. Většina lidí dokáže detekovat nadměrné množství kolem 600 mg/l [32]. Kyselina octová a jiné těkavé kyseliny jsou produktem bakteriální činnosti v napadeném víně, kde dochází k nepříjemným změnám chuti, vůně a vzhledu. Chuť vína nebývá narušena, pokud obsah těkavých kyselin v bílém víně nepřesáhne 0,5 - 0,6 g/l a v červeném víně 0,5 - 0,8 g/l. Zákonný limit obsahu těkavých kyselin je podle nařízení Evropské komise 0,92 - 0,98 g/l [8]. Kyselina se používá v textilním průmyslu, při výrobě laků, rozpouštědel a také v domácnostech při přípravě pokrmů [35].



Obrázek 5 – Strukturní vzorec kyseliny octové

1.4.7.2 Alifatické dikarboxylové a trikarboxylové kyseliny

Šťavelová kyselina je základním členem homologické řady alifatických dikarboxylových kyselin. Běžně se vyskytuje především v ovoci a zelenině [29]. V poslední době byl zjištěn vztah kyseliny šťavelové k mikrobiálnímu rozkladu ligninu a celulosy. Kyselina je produkována jako druhotný metabolit dřevokazných hub [36]. Kyselina je známá také jako ethandiová a její sloučeniny mají rozšířené průmyslové využití v několika oborech jako textilní, kožedělný, farmaceutický, tiskařský aj. Je důležitou chemikálií v ropě, inkoustu. Obvykle se vyrábí šesti způsoby, podle použitého surového materiálu. Materiálem může být ethylen, ethylen glykol, lignin, cukry [37]. Pro její stanovení existuje řada přesných metod, jako je např. HPLC, iontová chromatografie, plynová chromatografie a také je možno použít kapilární elektroforézu [38]. Ve víně a pivě jsou v malém množství přítomny kyseliny malonová, glutamová, šťavelová, adipová [29]. Ve větším množství se v některých druzích ovoce vyskytuje **jantarová kyselina**. Tato kyselina je meziproduktem cyklu kyseliny citronové, tedy citrátového cyklu. Vyskytuje se v nezralých plodech, kde při zrání dochází k jejímu přechodu enzymovými pochody ve vinnou a citronovou kyselinu [23]. Nejčastěji se nachází ve víně, ale ve stopových množstvích může být obsažena i ve zrajících hroznech. Vyšší koncentrace této kyseliny jsou v červených hroznech. Kyselina se vytváří během lihového kvašení, jako produkt metabolismu dusíku, pomocí kvasinek [32]. Je odolná proti mikrobiální kontaminaci za anaerobních podmínek a je obzvláště stabilní ve víně [34]. Jedná se o krystalickou látku tající při 185 °C a tvořící bezbarevné krystaly. Kyselina byla zjištěna v černém rybízu, třešních, jablkách a v hroznech. Ani jako 3% roztok nepoškozuje sliznici žaludku, zato má velmi nepříjemnou chuť [30]. Kombinace kyseliny jantarové s jednou molekulou ethanolu vytváří ester monoethylsukcinát, který je zodpovědný za mírné ovocné aroma ve víně [32]. Kyselina se používá při výrobě léčiv a její estery jsou považovány za dobré změkčovače [35].

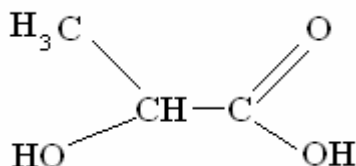


Obrázek 6 - Strukturní vzorec kyseliny jantarové

1.4.7.3 Alifatické hydroxykyseliny

Jedná se o netěkavé polární sloučeniny a jako vonné látky se v potravinách uplatňují jen zřídka [29]. Nejdůležitějším zástupcem je **kyselina mléčná**. Kyselina má jeden asymetrický uhlíkový atom, může se vyskytovat ve dvou opticky aktivních formách a to jako L - mléčná kyselina a D - mléčná kyselina. L - forma je pravotočivá a většinou bývá přítomna v masě a vnitřnostech, kde vzniká při tělesné námaze z glykogenu. Může se tvořit při mléčném kvašení cukrů, např. mikroorganizmem *Lactobacillus bulgaricus*. Levotočivá D - forma vzniká při kvašení cukrů jinými mikroorganizmy (např. *Bacterium aerogenes*). Technicky ji lze získat působením mikroorganismu *Pediococcus acidilactici* [23, 29]. Kyselinu lze vyrábět chemicky nebo fermentací. Zatímco chemickou syntézou vzniká pouze racemická směs, což je opticky inaktivní D, L - mléčná kyselina, tak v procesu fermentace mohou vzniknout stereoizomery kyseliny mléčné. Zajímavou aplikací je použití kyseliny mléčné jako monomeru pro syntézu biologicky rozložitelných homopolymerů [39]. Kyselina je spojována s mléčnou příchutí vína a je hlavní kyselinou v jogurtech a kvašeném zelí. V průběhu výroby vína ji vyrábí mléčné bakterie a to především tři rody : *Oenococcus*, *Pediococcus* a *Lactobacillus*. Tyto bakterie přeměňují cukry a kyselinu jablečnou na kyselinu mléčnou prostřednictvím jablečno - mléčného kvašení. Přeměna kyseliny jablečné na mléčnou může být pro některá vína prospěšná. Při přeměně dochází ke zmírnění drsnosti z jablečné kyselosti. Některé kmeny bakterií mohou vytvářet biogenní aminy, jako je histamin, putrescin, které mohou být příčinou bolesti hlavy při konzumaci červeného vína [32]. Kyselina mléčná je nejčastěji se vyskytující karboxylová kyselina, která má nejlepší pozici díky svému univerzálnímu použití v potravinářském, textilním, kožedělném, chemickém a jiném průmyslu. Je široce využívána v aplikacích, které souvisí s potravinami, ale v posledních letech se začala

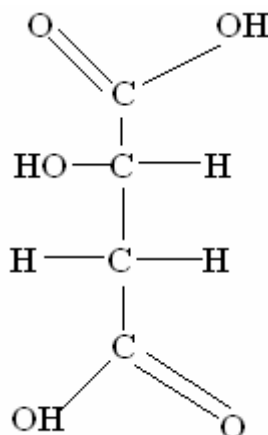
využívat i v jiných odvětvích. Kyselina mléčná se po desetiletí používá jako konzervační prostředek a je možné ji použít i jako acidulant (okyselující látka) v potravinách a nápojích [40].



Obrázek 7 - Strukturní vzorec kyseliny mléčné

K dikarboxylovým hydroxykyselinám patří **jablečná** neboli **hydroxyjantarová kyselina**. Řadí se mezi nejrozšířenější rostlinné kyseliny [35]. Může se vyskytovat ve dvou opticky aktivních formách, ale v přírodě byla zjištěna pouze ve formě levotočivé [23]. Kyselina jablečná se připravuje chemickou syntézou nebo mikrobiální cestou. Chemicky se kyselina jablečná syntetizuje hydratací kyseliny maleinové nebo fumarové za vysokého tlaku a teploty. Kyselinu lze připravit také fermentačně nebo biokonverzí kyseliny fumarové. Fermentačně je možno vyrobit kyselinu L - jablečnou ze sacharidových substrátů (glukóza, sacharóza) především pomocí vláknitých hub rodu *Aspergillus* (*Aspergillus flavus*) [40]. Obsah kyseliny se snižuje během kvašení činností kvasinek a lze ji zcela odbourat činností mléčných bakterií v mladých vínech. Při tomto kroku se zvyšuje hodnota pH. Úplné odbourání, při biologickém odbourávání kyselin, je žádoucí hlavně u červených vín. U většiny vín bílých a růžových se včasným zasířením činnost mléčných bakterií vylučuje, jinak by mohl obsah všech kyselin klesnout pod únosnou míru, která je potřebná k harmonickému souladu s ostatními látkami [8]. Vyšší obsah se nemůže snižovat přidávkem uhličitanu vápenatého jako u kyseliny vinné, protože kyselina jablečná tvoří snadněji rozpustné soli, a tak vápenatá sůl zůstává částečně v roztoku [6]. Jablečná kyselina tvoří bílé krystalky, slepené v hrudky, lehko se rozplývající na vzduchu. Je snadno rozpustná ve vodě a alkoholu a je těžko rozpustná v etheru. Převládající výskyt této kyseliny je v jablkách a v jádrovém ovoci [30]. Ve farmacii se používá do prostředků proti kašli, přidává se i do umělých sladidel, čímž se potlačuje jejich hořká chuť [41]. Vína z chladnějších oblastí mají více kyseliny jablečné než vína z teplejších oblastí. V hroznech révy vinné je kyselina jablečná zahrnuta v několika procesech, které jsou důležité pro zdraví a udržitelnost révy vinné. Chemická struktura umožňuje podílet se na enzymatických reakcích, které přenáší energii v révě. Při dozrávání révy vinné

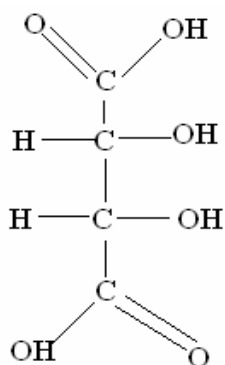
je kyselina jablečná metabolizována v procesu dýchání a při sklizni je množství kyseliny nízké, 1 - 9 g/l. Respirační ztráty kyseliny jsou výraznější v teplejším podnebí. Vinaři musí kompenzovat tuto ztrátu ručně a to přidáváním kyseliny. Tomuto procesu se říká přikyselování. Kyselinu je možné snížit během procesu jablečno - mléčného kvašení [32]. Obsah kyseliny jablečné je jedním z hlavních ukazatelů, které se používají při určení termínu sklizně hroznů [34].



Obrázek 8 - Strukturní vzorec kyseliny jablečné

Vinná (2,3 - dihydroxyjantarová) kyselina a její soli jsou nejstabilnější organické kyseliny nalezené v ovocné šťávě, v souvislosti s mikrobiologickým napadením [42]. Kyselina se vyskytuje ve čtyřech isomerech, jako levotočivá, pravotočivá, hroznová a mesovinná (opticky neúčinná) [43]. V přírodě se nejčastěji vyskytuje kyselina D - vinná (pravotočivá) a pouze výjimečně kyselina hroznová [30]. Hydrát kyseliny vinné tvoří bezbarvé krystaly, které mají příjemnou kyselou chuť, jsou stálé na vzduchu a rozpustné ve vodě a v alkoholu vína. Kyselina vinná při zahřátí ztrácí vodu, při vyšší teplotě uhelnatí a během tohoto procesu tvoří velmi zvláštní a charakteristickou vůni, která se podobá karamelu [44]. Hroznová kyselina (racemická směs obou izomerů) byla dokázána jako dihydrát ve šťávě hroznů, po nichž byla také pojmenována [23]. V závislosti na pH roztoku, může být kyselina vinná přítomná v aniontové formě, jako vinan nebo hydrogenvinan. V nestabilizovaných vínech tyto formy způsobují krystalické srážky hlavně s vápníkem a ionty draslíku [45]. Hydrogendraselná sůl vinné kyseliny je špatně rozpustná ve vodě, nerozpustná v alkoholu a vylučuje se jako tzv. vinný kámen během kvašení vína [29]. Přírodní L - forma kyseliny vinné se získává izolací z vinného kamene a kalu a to jako vedlejší produkt při výrobě vína. Proto se největší výrobci nachází

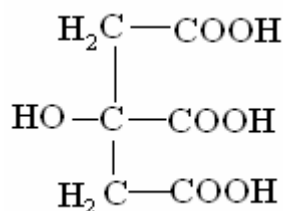
v oblastech s největším vinařským průmyslem (Itálie, Francie, Portugalsko). Z vinného kamene se připraví vinan vápenatý, ze kterého se poté izoluje kyselina vinná. Nevýhodou této výroby je sezónnost základního materiálu. Proto se vytvořily jiné metody výroby této kyseliny [41]. Vinná kyselina se vyskytuje ve větším množství pouze v hroznech, kde je doprovázena hroznovou kyselinou a L - jablečnou kyselinou. V ostatním ovoci nebyla vinná kyselina objevena, pouze některé bobulové ovoce ji obsahuje v nepatrném množství např. červený rybíz, angrešt, brusinky [30]. Kyselina vinná působí na kyselost vína, čímž ovlivňuje barvu, chuť, chemickou a mikrobiologickou stabilitu finálního výrobku [46]. Během kvetení je vysoký obsah kyseliny koncentrován v květech hroznů a mladých bobulích. V průběhu zrání vinné révy nedochází ke snížení obsahu kyseliny prostřednictvím dýchání, jako je to typické pro kyselinu jablečnou [32]. Kyselina se vytváří v zelené části rostliny, převádí se do kořenů a později stoupá opět do zelených orgánů. V hroznech je její obsah celkem stabilní a snižuje se až při teplotě kolem 30 °C. V nedostatečně zasířených vínech, jež jsou uchovávány v teplejším prostředí mohou mléčné bakterie rozkládat kyselinu vinnou na kyselinu mléčnou a octovou, čímž dochází k nechtěnému zvrhnutí vína [8]. Kyselina vinná se nejvíce využívá v potravinářství, kde slouží jako acidifikační činidlo do džusů, práškových nápojů. Ve farmaceutickém průmyslu se soli kyseliny využívají při výrobě antibiotik, technická kyselina vinná se používá převážně ve fotografickém, metalurgickém a keramickém průmyslu [41]. Množství kyseliny vinné je parametr kritické kontroly v procesu stabilizace vína. Má význam při odhalení změn ve víně nebo v odhalení nemocí vína [28].



Obrázek 9 - Strukturní vzorec kyseliny vinné

Nejvýznamnějším zástupcem trikarboxylových hydroxykyselin je **kyselina citronová**. Nachází se stejně jako kyselina jablečná a vinná v mnoha druzích ovoce, průmyslově se vyrábí kvašením melasy, např. plísněmi *Aspergillus niger* a takto průmyslově vyrobená

kyselina se používá jako kyselinový doplněk nebo se získává z citronové šťávy [29]. Tyto kyselinové doplňky patří mezi levné látky a vinaři je používají ke zvýšení celkové kyselosti vína. Kyselinu v malém množství obsahuje i mléko, je přítomná také v krvi a v moči [35]. Díky své agresivní příchuti se doplňky používají méně, na rozdíl od doplňků kyseliny vinné a jablečné. Lze ji použít jen v minimálním množství pro odstranění nadměrného množství železa a mědi z vína [32]. Krystalizuje v kosočtverečné soustavě s jednou molekulou vody, je snadno rozpustná ve vodě a v alkoholu, velmi těžko se rozpouští v etheru. Při 130°C ztrácí krystalickou vodu, při 150°C taje a teprve při velmi vysoké teplotě se rozkládá. Kyselina citronová vytváří 3 druhy solí. Soli alkalických kovů jsou rozpustné ve vodě, ostatní soli jsou většinou nerozpustné [30]. Kyselina citronová se v moštu vyskytuje v menším množství, výjimku tvoří mošty, které jsou napadeny plísní šedou nebo jsou vyrobeny z hroznů sušených na slámě [8]. Používá se při barvení v textilním průmyslu, v potravinářském průmyslu při výrobě nápojů a v medicíně na konzervování krve [35].



Obrázek 10 - Strukturní vzorec kyseliny citronové

Jablečno - mléčné kvašení

Za jablečno – mléčné kvašení jsou odpovědné bakterie mléčného kvašení, především kmeny *Leuconostoc oenos* [47]. Jedná se o proces, při němž dochází ve víně k přeměně malátu v laktát [48]. Transformace diacidu (kyseliny jablečné) na monoacid (kyselinu mléčnou), má vliv na kvalitu a chuť vína a tím dochází také ke snížení celkové kyselosti vína [49]. Mezi fyzikálně – chemické parametry, které ovlivňují jak metabolismus organických kyselin, tak rychlost jablečno – mléčného kvašení patří teplota [50]. Jablečno – mléčné kvašení je žádoucí v případě, že se víno vyrábí v mírném klimatu. Zatímco méně příznivé je v teplejších oblastech, protože stupeň kyselosti moštu je nižší [48]. Jablečno - mléčné kvašení se využívá především v technologii výroby červeného vína, je ho však možné použít i při výrobě vína bílého. Může k němu docházet činností

mléčných bakterií, které se spontánně vyskytují na hroznech, ve vinicích nebo ve vinařském provozu. Použitím čistých bakteriálních kultur je umožněno výrobcům vína načasovat jablečno - mléčné kvašení a tím ovlivnit délku odbourávání kyseliny jablečné. Úspěšné provedení jablečno - mléčného kvašení má pozitivní vliv na stabilitu vína. Dá se tedy říct, že vína s dobře provedeným odbouráním kyseliny L - jablečné na kyselinu L - mléčnou jsou mikrobiálně stabilní [2].

Stanovení organických kyselin

U vína se stanovuje celkový obsah titrovatelných kyselin (souhrn titrovatelných volných kyselin těkavých a netěkavých při neutralizaci vína, pomocí alkalického hydroxidu). Bod ekvivalence je možné určit potenciometricky [51]. Kyselost je možné vyjádřit v gramech kyseliny vinné (u sladových vín jako kyselina citronová) na 1 l vzorku (1 ml 0,25 N NaOH odpovídá 18,75 mg kyseliny vinné nebo 16 mg kyseliny citronové) [52]. Dále je možné určit těkavé kyseliny (ty přechází při destilaci vodní parou do destilátu). Kyseliny se oddestilují z vína vodní parou a poté se destilát titruje roztokem NaOH [50]. Výsledek je možno vyjádřit v gramech kyseliny octové na 1 l vzorku (1 ml 0,1 N NaOH odpovídá 6 mg kyseliny octové) [52]. Netěkavé kyseliny (rozdíl mezi celkovým obsahem kyselin a obsahem těkavých kyselin) [51]. Výsledek se přepočítá vynásobením pomocí faktoru 1,25 na kyseliny vinnou (u révových vín) nebo faktorem 1,067 na kyselinu citronovou (u sladových vín) a toto se poté odečte od množství celkových kyselin [52]. Pro stanovení organických kyselin ve víně bylo vyvinuto hodně analytických metod, mezi nejčastěji používané techniky patří vysoce účinná kapalinová chromatografie [53]. Principem stanovení organických kyselin je předešlá destilace těchto kyselin ze vzorku s vodní parou a následné nadávkování do kapalinového chromatografu. Je možné místo destilace použít centrifugaci a získaný supernatant poté nadávkovat do kapalinového chromatografu. Podrobnější popis stanovení organických kyselin ve vzorcích vín bude podrobněji popsáno v praktické části [54]. Pokud se tato metoda použije s UV detekcí, tak má špatnou citlivost a selektivitu, čímž je prodloužen čas analýzy, což je nežádoucí [53]. Při použití této metody byla rovněž určena separační účinnost, vliv eluce gradientu a derivatizace organických kyselin ve víně. Pro derivatizaci byly použity různé prostředky jako např. p-nitrobenzyl, estery [55]. Náklady na analýzu pomocí HPLC jsou poměrně nízké, ve skutečnosti náklady na stanovení šesti organických kyselin ve víně činí

jen asi 3 dolary (do ceny je zahrnuta spotřeba činidla a rozpouštědla, filtry a opotřebení sloupců) [56]. Lepší oddělení je dosaženo iontově-výměnou chromatografií, ale použití této metody je kvůli nutnosti čištění vzorku červeného vína omezeno [53]. V současné době převládá při stanovení kyselých složek vína použití spektrofotometrie, kapilární elektroforézy. Výhodou kapilární elektroforézy jsou krátké časy při analýze, dále je to buď žádná nebo jen minimální úprava vzorku [57]. Nejčastěji používané metody pro stanovení jablečné a mléčné kyseliny jsou založeny na použití enzymů [49].

a. Stanovení kyseliny mléčné

Kyselinu mléčnou je možné stanovit spektrofotometricky, kdy se kyselina převede působením kyseliny sírové na acetaldehyd. Acetaldehyd je poté stanoven spektrofotometricky po reakci s *p*-hydroxydifenylem [52].

b. Stanovení kyseliny jablečné

Kyselina se nejčastěji stanovuje alkalimetry, po předchozím odstranění interferujících látek (ve formě Ba^{2+} nebo Pb^{2+} solí) nebo chromatograficky na sloupci silikagelu. Alkylestery kyseliny jablečné je možné stanovit plynovou chromatografií [52]. Stanovení L – jablečné kyseliny je založené na enzymatických metodách, spolu s několika analytickými metodami vhodnými pro stanovení NADH [48].

c. Stanovení kyseliny vinné

Při stanovení kyseliny vinné je základem její převedení na vinan vápenatý nebo hydrogenvinan draselný, který se poté stanoví alkalimetry. Alkylestery kyseliny vinné lze stanovit také plynovou chromatografií. Při alkalimetrickém stanovení kyseliny ve víně se kyselina převede na hydrogenvinan draselný, jež se za pomoci etanolu vysráží a titrací NaOH se stanoví [52].

d. Stanovení kyseliny citronové

Pro stanovení se většinou používají vážkové metody nebo alkalimetrické metody po předchozím oddělení kyseliny na sloupci silikagelu. Je možné ke stanovení použít plynovou chromatografii [52]. Chceme-li přesně určit obsah kyseliny citronové, tak lze použít vysoce účinnou kapalinovou chromatografii [58].

2 ROZDĚLENÍ VINAŘSKÝCH OBLASTÍ

Vinice v České republice na konci roku 2009 dosáhly celkové plochy přes 19 646,73 hektarů. Do této plochy se nezahrnují pouze nyní obdělávané vinice, které činí 17 418,68 ha, ale také vinice vykloučené, vinice s právem na opětovanou výsadbu a také vinice, které tvoří státní rezervu [59]. Domácí produkce vína tvořila v roce 2007 téměř 750 000 hektolitrů, a vína bílá tvořila kolem 60% [8]. Každá vinařská oblast se vyznačuje zvláštními klimatickými podmínkami a různým složením půd, na kterých se réva vinná pěstuje. Velkou úlohu hrají také vybrané plochy vinic, u kterých se uplatňují klimatické i půdní vlivy na vývoj a dozrávání hroznů. Vína ze severnějších oblastí se vyznačují vyšším obsahem kyselin, nižším obsahem alkoholu a vyšším obsahem aromatických látek. Vína z jižních vinařských oblastí jsou plnější a mají vyšší obsah alkoholu. Červená vína mají vyšší obsah jemných tříslovin a výraznější barvu [6]. Vinice jsou zakládány většinou na svažitéch terénech a na méně úrodných půdách, kde by jiné plodiny neposkytovaly takové výnosy [12]. Téměř 96 % celkové plochy vinohradů, lze nalézt na území Jihomoravského kraje, z toho polovinu na Břeclavsku, třetinu na Hodonínsku, rozlehlé vinohrady jsou také na Znojemsku, Brněnsku a Uherskohradištsku. Území České republiky bylo podle vinařského zákona z roku 1995 rozděleno na šestnáct vinařských obcí, deset nalezneme na Moravě a šest v Čechách. Novela zákona z roku 2004 zavedla nové rozdělení, kdy některé původní oblasti byly sloučeny do větších celků [60]. Oblasti pěstování révy vinné rozdělují na český a moravský vinařský region. Vinařská oblast Čechy je tvořena dvěma podoblastmi a vinařská oblast Morava je tvořena čtyřmi podoblastmi [59].



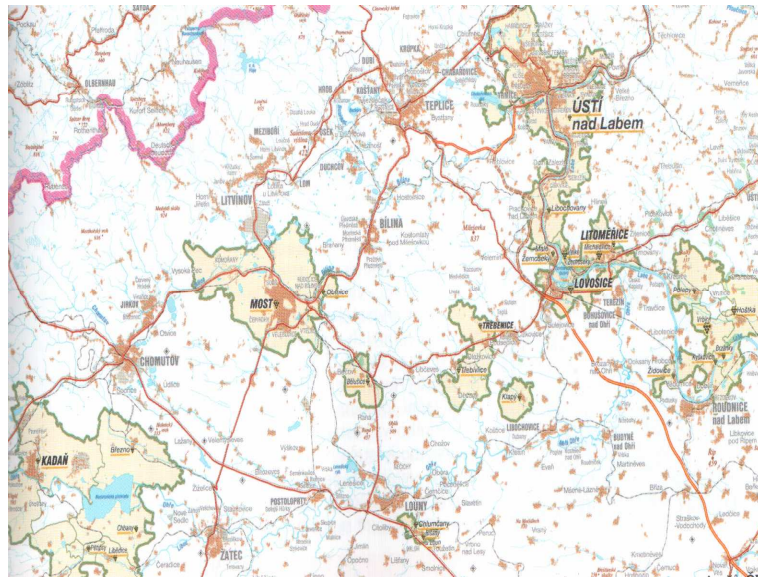
Obrázek 11 – Vinařské oblasti a podoblasti České republiky podle vyhlášky č. 324/2004 Sb. [8]

2.1 Český vinařský region

Český region je velmi malý, nalezneme zde asi 695 ha vinic, což činí jen čtyři procenta všech vinic České republiky [8]. Jedná se o zbytky rozsáhlých vinic, které zde byly již za vlády Rudolfa II [61]. Výroba v českém vinařském regionu je zaměřena hlavně na výrobu bílých vín, výroba červených vín je zde jen v malém měřítku [6]. Vinice jsou rozmístěny na rozsáhlém území středních, západních a severních Čech, především poblíž velkých řek - Vltavy, Labe, Berounky a Ohře. Nejvíc vinic je v okolí Mělníka, Litoměřic a Mostu. Vinice ve vinařské oblasti Čechy patří v rámci Evropy mezi nejseverněji položené a nejrozmanitější, což je dáno různými tvary zdejší krajiny, rozdílnými klimatickými podmínkami a pestrým geologickým podložím [8]. Průměrná roční teplota je zde kolem 8 °C, ve vegetačním období 14,5 °C, slunce svítí 1600-1800 hodin ročně a srážky se pohybují od 500 do 550 mm za rok. Půda je tvořena vápenitými, ale také zvětralými čedičovými horninami [61].

2.1.1 Vinařská podoblast litoměřická

Vinice se zakládají v okolí velkých měst, která bývala dříve významnými vinařskými středisky. Litoměřice, Roudnice nad Labem, Louny, Most a Kadaň spolu odedávna soupeřily rozlohou vinic a také obchodováním s vínem. Nositeli vinařské tradice byly rovněž kláštery, mezi nejznámější patří cisterciácký klášter Osek, klášter františkánů v Kadani aj. [8]. Vinice se nachází na prudkých svazích kolem řeky Labe. Vyrábějí se zde suchá, bílá odrůdová vína, např. Sylván zelený, z červených vín Svatovavřínecké [61].



Obrázek 12 – Vinařská podoblast litoměřická [60]

2.1.2 Vinařská podoblast mělnická

Oblast spojuje části středních Čech od Čáslavi přes Kutnou Horu a Mladou Boleslav až po Mělník, Slaný a Karlštejn. Součástí je také Praha, která byla vyhlášeným vinařským centrem a dodnes hraje klíčovou roli v obchodu s vínem [8]. Vinice se nachází na soutoku řek Labe a Vltavy. Produkují se zde lahodná vína známková i odrůdová. Mezi nejznámější patří víno Ludmila, které se plní do široce válcovitých nízkých lahví zvaných kalamáře [61].

2.2 Moravský vinařský region

Na Moravě se réva pěstovala tradičně u každé zemědělské usedlosti a také v zahradách, o čemž svědčí dodnes užívané malé vinné sklípky, nazývané také budy [6]. Jižní Morava má díky klimatickým a půdním podmínkám všechny předpoklady pro pěstování révy vinné [12]. Tato vinařská oblast leží mezi 48° 40' severní šířky jižního cípu Moravy a mezi 49° 20' v okolí Brna a zahrnuje 96 % ploch registrovaných vinic v České republice. Zrání hroznů probíhá v této oblasti pomaleji, a proto se v hroznech udrží a koncentruje větší množství a větší pestrost aromatických látek [3]. Průměrná roční teplota je 10 °C, ve vegetačním období 15 °C. Průměrné srážky jsou různé, dosahují 500 - 700 mm ročně. Vinice se zakládají na svazích a také v rovinách [61]. Do čtyř podoblastí je rozděleno téměř 17 000 hektarů [8].



Obrázek 13 – Moravské vinařské oblasti [6]

2.2.1 Vinařská podoblast mikulovská

Oblast je soustředěna okolo Pavlovských vrchů. Od nejstarších dob se zde nacházela rušná křižovatka kultur, jak dokazují archeologické nálezy, jako např. soška z vypálené hlíny, která se nazývá podle místa nálezů v Dolních Věstonicích Věstonická Venuše. Vinařské podoblasti kralují města s bohatou vinařskou historií, Mikulov a Valtice [8]. Jedná se o oblast převážně vín bílých, která mají plnou chuť a výrazný odrůdový charakter. Pěstují se zde odrůdy Muškát moravský, Veltlínské zelené, Chardonnay, Aurelius [61].



Obrázek 14 – Vinařská podoblast mikulovská [60]

2.2.2 Vinařská podoblast slovácká

Tato oblast vznikla sloučením původních vinařských oblastí (bzenecké, kyjovské, mutěnické, Podluží, strážnické a uherskohradištské) [60]. Jedná se o nejpestřejší podoblast, která zahrnuje nejvýchodnější a nejsevernější území jižní Moravy. Na jihu se dotýká státních hranic s Rakouskem a Slovenskem. Území dále pokračuje podél dolního toku řeky Moravy a podél hranic se Slovenskem. Vedle vyhlášených měst jako jsou Hodonín, Kyjov, Strážnice, Uherské Hradiště nalezneme mnoho vinařských dědin a sklepních uliček [8].



Obrázek 15 – Vinařská podoblast slovácká [60]

2.2.3 Vinařská podoblast velkopavlovická

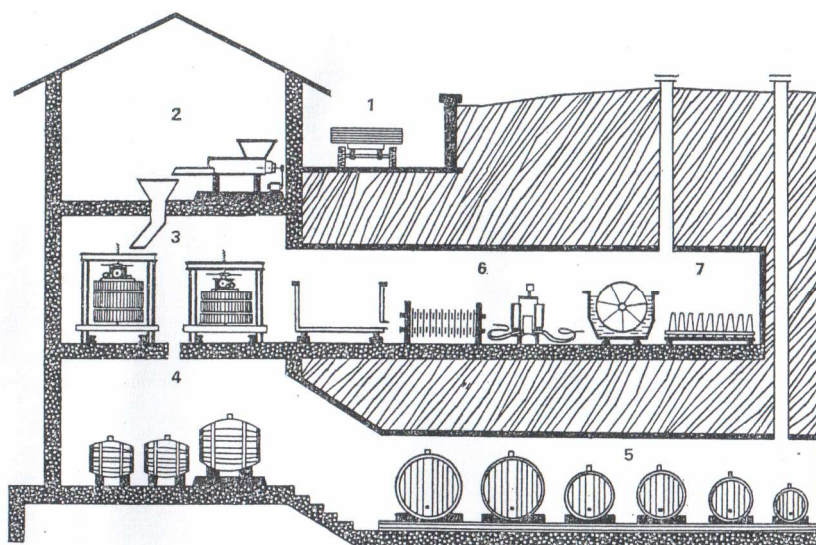
Jedná se o oblast především červených vín, z nichž mezi nejznámější patří Frankovka, Svatovavřínecké, Modrý Portugal [61]. Půdní podmínky jsou tvořeny buď vápenatými jíly, slínou nebo pískovcem. Z vodních toků protéká podoblastí Svratka a Litavka. Tato oblast patří mezi nejslunnější a nejteplejší místa na našem území, a proto se na půdách bohatých na hořčik daří červeným odrudám [8].

2.2.4 Vinařská podoblast znojemská

Znojemská oblast má nejvíce vinařských obcí, z nichž je nejznámější Znojmo, Šatov a Nový Šaldorf. Jedná se o oblast především bílých vín. Dozrává zde Rulandské šedé, Ryzlink rýnský, Ryzlink vlašský [61].

3 TECHNOLOGIE VÝROBY VÍNA

Hlavní surovinou na výrobu vína jsou používány čerstvé hrozny, které jsou čisté, zdravé, vyzrálé, odrůdově jednotné a rozříděné podle barvy na bílé, růžové, červené a modré [3, 20]. Zásadou při výrobě by mělo být zpracování hroznů v den sklizně. Je důležité zabránit zapaření hroznů. Pouze výjimečně se mohou hrozny zpracovat až následující den, ale v takovém případě se hrozny musí skladovat v chladu a posypat disiřičitanem draselným nebo sodným [10]. Víno patří mezi nejdéle známý alkoholický nápoj a je zařazeno mezi pochutiny [19]. Výroba vína zahrnuje řadu činností prováděných prostřednictvím různých metod, od tradiční „zemědělské výroby“, až po moderní průmyslovou výrobu. Metoda lisování hroznů, kdy kombajny drtily v noci hrozny, které byly nasbírané během dne, je v současné době už používána zcela výjimečně. Aktuální technologické možnosti dovolují vyrábět víno v podnicích, které jsou vybaveny pro produkci více typů vín (rozdílné technologie při výrobě bílého, růžového, červeného, šumivých vín) a hygienické standardy v těchto zařízeních snižují riziko kontaminace nežádoucí mikroflórou, především riziko napadení vína či moštu octovými bakteriemi [62].



Obrázek 16 – Schéma výroby vína [20]

1 – skládka hroznů, 2 – odzrňování hroznů, 3 – lisování, 4 – kvašení, 5 – ležácký sklep, 6 – stáčení, scelování, školení a filtrace vína, 7 – lahvování a expedice

3.1 Přejímka hroznů

Sklizené hrozny se do zpracovatelských závodů dopravují v kádích, v sudech, podle oblasti zpracování. U hroznů se na vahách zjišťuje hmotnost, průměrná cukernatost. Abychom zjistili cukernatost, tak musíme použít moštoměry. Cukernatost se u nás vyjadřuje ve °ČNM a udává množství cukru v kg/100 l moštu nebo ve °Kl, které udávají množství cukru v hmotnostních % při 20 °C. V automatizovaných linkách je možno cukernatost zjistit refraktometricky [19].

3.2 Drcení hroznů a příprava rmutu

Hrozny se co nejdříve po sklizni drtí - rmutují [5]. Odděluje se třapina od bobulí, třapiny je možné považovat jako odpad a většinou se používají jako hnojivo [3]. Během drcení by každá bobule měla prasknout, nemělo by dojít k poškození semen a slupky. Kdyby k poškození došlo, tak by se do moštu mohly vyluhovat nežádoucí látky, jako jsou třísloviny, chlorofyl a oleje [5]. Chlorofyl společně s tříslovinami zhoršují kvalitu budoucího vína a způsobuje travnatou příchut' [10]. Šťáva z většiny hroznů má bílou barvu, proto lze získat bílé víno i z červených hroznů. Téměř okamžitě po rozdrcení se odděluje mošt od slupky u bílých vín, zato u červených vín slupky zůstávají společně se šťávou, a s ní jdou i do fermentační nádoby [63]. K drcení hroznů je možné použít mlýnky (válnové, bubnové, kladívkové a odstředivkové) [19]. Modré odrůdy hroznů a některé bílé odrůdy je možné před lisováním odzrnit na odzrňovačích, které se v případě spojení s drtícími mlýnky nazývají mlýnkoodzrňovače [6]. Odzrňování je možné provádět na různých vystíracích nebo odstředivkových odzrňovačích, ve kterých se ve válci, který je perforovaný zachycují třapiny, ale vznikající rmut válcem protéká do sběrné nádrže [19]. Abychom usnadnili lisování, necháme nadrcený rmut asi 3 - 4 hodiny odležet. Z nadrceného rmutu je možné získat mošt, který se jímá odděleně. Ještě před lisováním uvolňuje odkapaný rmut další část moštu [20]. U bílých odrůd se nakvašení provádí po dobu 12 - 24 hodin, aby nedošlo k vyluhování nežádoucích látek (třísloviny, chlorofyl). Jako konzervační prostředek se do drti může přidávat oxid siřičitý [16]. Při výrobě červených vín necháváme rmut z modrých odrůd nakvasit [10]. Pokud se nakvašuje při teplotě 15 °C, tak doba nakvašování nemá být delší než 8 dní. Delším nakvašováním víno zhnědne, získá nepříjemnou chuť a octovatí. Při kvašení vzniká oxid uhličitý, který na povrch vynáší nečistoty a ty na povrchu tvoří vrstvu, které se říká

klobouk. Při styku klobouku se vzduchem dochází na jeho povrchu k octovému kvašení a v místě styku klobouku se vzduchem nedochází k vyluhování barviv. Z tohoto důvodu se klobouk musí do kvasícího rmutu ponořovat [5]. Rmut se nechává nakvášet v otevřených popřípadě v uzavřených dřevěných nebo betonových kádích [20].

3.3 Lisování rmutu

Po vylisování se získává mošt. Koncentrace cukru v moštu je obvykle od 10 % do 20 % a koncentrace alkoholu by měla být do 12 % [64]. Pro získání bílého vína se hrozny lisují včetně třapin, vznikající mošt se nechává kvasit bez nich. Zato pro výrobu červeného vína se bobule po odzrnění oddělují od třapin a červené zbarvení vzniká při zkvašování moštu společně se slupkami bobulí [65]. Na lisování se používají hydraulické, pneumatické nebo kontinuální lisy [6, 20]. Při lisování je důležité použít nízký tlak na začátku lisování, který se postupem času pomalu zvyšuje. Tím dochází k lepšímu odtoku moštu [8]. Výlisnost hroznů je okolo 75 % a závisí na odrůdě a kvalitě hroznů. Z tohoto množství tvoří 60 % samotok, 26 % připadá na první lisování, 10 % na lisování druhé a asi 4 % na třetí lisování [5]. Samotok je možné použít na výrobu lehčích vín nebo po naležení na vína plnější. Střední podíl (26 %) je přidáván k samotoku a dotažek nebo také dolisek (10 %), obsahuje více taninů, draslíku, hořčin a také barviv. Dotažek má méně kyselin i cukrů a zpracovává se na víno stolní [8]. Samotok díky malému obsahu tříslovin lze zpracovávat odděleně. Ze 100 kg hroznů se získá obvykle 90 l rmutu, tj. 75 l moštu [19]. Z důvodu nakvašování se z červeného rmutu uvolňuje mošt rychleji, než když dochází k lisování rmutu z bílých hroznů. Hrozny je třeba lisovat ve večerních, popřípadě nočních hodinách. Hrozny se nemají nechat v nádobách déle než 24 hodin, protože by mohlo dojít k zapaření hroznů a mohly by se rozvinout nežádoucí mikroorganismy. Vylisovaný a přecezený mošt se plní do $\frac{3}{4}$ kvasného sudu [20]. Při lisování je nutné dodržovat čistotu, proto se lis a všechno doplňující zařízení musí důkladně umýt [10].

Tabulka 2 – Obsah jednotlivých látek v bobulí a v moštu (hm%) [2]

Skupina látek	Obsah v bobulích	Obsah v moštu
Voda	74	76
Anorganické soli	0,5	0,4
Cukry	24	23
Alkoholy	0,0	0,0
Kyseliny	0,6	0,7
Fenolické látky	0,2	0,01
Dusíkaté látky	0,2	0,1
Lipidy	0,2	0,01
Aromatické látky	0,03	0,02

3.4 Odkalení moštu

Mošt po vylisování bývá zakalený, protože v něm zůstávají pevné částice, které většinou pochází z bobulí, semen, ze slupek, dužiny nebo také z třapin [2]. Alkohol, který vzniká při kvašení, by z kalných částic vyluhoval nežádoucí látky, čímž by došlo ke snížení jemnosti vína a z toho důvodu je třeba kalné částice z moštu odstranit [8]. Při stáčení vína od kalů se víno částečně provzdušní a tím dojde k vysrážení kalových částic. Dříve se stáčení vína od kalů opakovalo. Nyní, při použití filtrace křemelinou, stačí pouze jedno stáčení [6]. Používaný způsob odkalování v praxi se provádí tak, že čerstvě vylisovaný mošt naplníme do silně zasířených sudů nebo se mošt zasířuje 15-20 gramy disiřičitanu draselného na 1 hl. Sudy se umístí do chladného prostředí na dobu 12-24 hodin a za tuto dobu se mošt výrazně vyčistí [10].

3.5 Úprava moštu pro kvašení

Na rozdíl od ovocných vín je zakázáno ředit révový mošt vodou, popřípadě vodnými cukernými roztoky [66].

3.5.1 Úprava kyselin v moštu

Mošty je možné odkyselit chemicky za použití uhličitanu vápenatého, který se váže na kyselinu vinnou a tvoří nerozpustný vinan vápenatý [6]. Chceme-li snížit kyselost o 1 gram kyseliny vinné v 1 litru moštu, použijeme 0,666 g uhličitanu (CaCO_3) [2]. Dalším způsobem jak snížit obsah kyselin, je scelování s málo kyselým vínem [16]. Obsah kyselin

v moštu bývá okolo 0,7 %. Pokud je průměrný rok, tak vína obsahují takové množství kyselin, že jej není třeba upravovat. Naopak v teplých obdobích se kyselost snižuje a může se zvýšit přidáním kyseliny vinné nebo citronové [5]. Odkyselování je možno provádět před kvašením nebo před prvním stáčením, avšak musí se pamatovat na to, že kvašením, stáčením nebo scelováním se kyselost vína snižuje [20].

3.5.2 Úprava cukernatosti

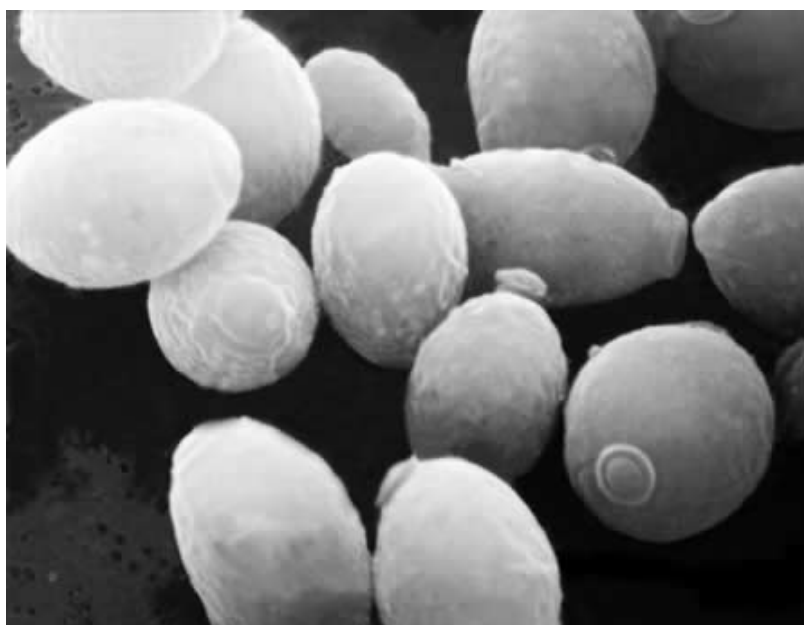
Po odkalení a před kvašením je nutné provést úpravu cukernatosti [2]. Pokud cukernatost moštu nedosahuje 20 °ČNM, tak je povoleno přidávat sacharózu popřípadě zahuštěný mošt [16]. Chceme-li zvýšit obsah cukru o 1 °ČNM, tak se přidává 1,053 kg cukru/hl moštu [20]. Přídavek cukru zvyšuje v konečné fázi obsah ethanolu. Pokud se vyrábí červené víno, tak se obsah cukru upravuje před nakvašováním rmutu [5].

3.5.3 Síření moštu

Síření má za účel snížit oxidoredukční potenciál a to tím způsobem, že oxid siřičitý (SO_2), který je redukční činidlo, váže molekuly kyslíku ve víně a tím zabraňuje oxidaci vína. Síření rovněž brání vzniku kvasničných zákalů [6, 20]. Množství použitého oxidu siřičitého je dáno nařízením Komise (ES) č. 606/2009 ze dne 10. července 2009 [67]. Pokud se síří zdravý mošt, tak se používá menší dávka a to 10-30 mg SO_2 /l [6, 20]. Síření při kvašení podporuje vznik glycerolu, který dodává vínům plnost. Pokud se síří vína červená, tak dochází k mírnému odbarvení antokyanových barviv, ale také dochází k zabránění pozdější oxidace, čímž se získají vína, která mají intenzivnější červenou barvu [5]. Uvnitř buněk reaguje oxid siřičitý s enzymy, aminokyselinami, bílkovinami i tuky. Schopnost oxidu siřičitého reagovat s různými látkami udává jeho polyvalentní působení a také vysvětluje důvod, proč nebyl SO_2 nikdy nahrazen jinou sloučeninou [8]. Oxid siřičitý je účinný proti plísním, bakteriím a aerobním kvasinkám, v moštu potlačuje především divoké kvasinky a tím vytváří vhodné podmínky pro působení kulturních kmenů kvasinek. K síření se používají sirné knoty, disiřičitan draselný a to jak v podobě prášku, tak v tabletách [10].

3.6 Kvašení moštu

Na kvašení se podílí nejen ušlechtilé kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* var. *vini*, ale také mikroflóra, která se dostala na hrozny ve vinnicích [20]. Kromě kvasinek jsou přítomny i bakterie. Kvasinkám se obecně daří v prostředí s nízkým pH a kde je obsah živin v samostatné šťávě vhodný pro růst kvasinek. V počáteční fázi kvašení vína je přítomna různorodá populace kvasinek, včetně druhů *Candida*, *Kloeckera*, *Saccharomyces* [68]. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* převládají ve fázi kvašení, kde je vysoká koncentrace alkoholu a ostatní kvasinky jsou touto koncentrací zničeny [64].



Obrázek 17 – *Saccharomyces cerevisiae* [69]

Při kvašení dochází současně k aerobním i anaerobním pochodům. Mezi anaerobní pochody patří alkoholové kvašení a jako aerobní přeměna je označováno dýchání, kdy dochází k přeměnám cukru a kyseliny pyrohroznové. Může dojít také k oxidaci alkoholu pomocí octových bakterií a ke vzniku kyseliny octové [65]. Alkoholové kvašení rozdělujeme do tří fází a to na začátek kvašení (v této fázi dochází k rozmnožení kvasinek a trvá 2-4 hodiny), bouřlivé kvašení (trvá 7 - 14 dnů, dochází ke vzniku velkého množství oxidu uhličitého a tepelné energie, díky které se mošt ohřívá na 25 - 28 °C) a dokvašení, které nastává po poklesu obsahu cukru na 2 - 5 g/l, trvá měsíc a někdy i půl roku [10, 16, 19]. Mezi cukr, který je přeměňován patří glukóza a fruktóza, které se mění na ethanol a oxid uhličitý. Teoreticky by mělo ze 100 g glukózy vzniknout 51,11 g ethanolu a 48,89 g oxidu uhličitého. Avšak ve skutečnosti nevzniká tolik ethanolu, jakoby

mělo, ale vzniká pouze 48 g ethanolu. Kromě něj vzniká velké množství jiných produktů (glycerin, estery, aldehydy), které vytváří kvasný buket [8]. Alkohol (ethanol), který vznikl, působí ve vyšších koncentracích konzervačně a prodlužuje trvanlivost vína a zároveň se alkohol podílí na tvorbě chuti a vůně [5]. Na nežádoucí mléčné kvašení jsou náchylná vína, která dlouho kvasí (mají málo kyselin) a vína obsahující zbytkový cukr [16]. Při kvašení se musí vytvořit příznivé podmínky pro kvasinky, jedná se především o dostatečné množství cukru a teplotu. Nejlepší teplota sklepu v době kvašení by měla být 15 - 16 °C, při této teplotě mošty nejlépe a hlavně rovnoměrně kvasí. Pokud se teplota zvýší nad 20 °C, tak dochází k rychlému prokvašení moštu a zároveň dochází ke ztrátě alkoholu a buketu. Naopak nízké teploty kvašení způsobí nedokonalé a pomalé prokvašení [10]. V posledních třiceti letech došlo ve vinařském průmyslu ke změně, kdy spontánní kvašení bylo postupně nahrazeno řízeným kvašením, které je spolehlivější a usnadňuje výrobu vína [70]. Při spontánním kvašení je třeba kontrolovat průběh aplikace oxidu siřičitého a to z důvodu přítomnosti rozmanité mikroflóry. Tato aplikace snižuje přítomnost bakteriální populace [2]. Při řízeném kvašení se v poslední době uplatňuje používání zákvasů čistých kulturních kvasinek, které se většinou aplikují ve formě suspenze nebo v suché aktivní formě. K tomuto účelu se začalo používat více než 150 kmenů kvasinek rodu *Saccharomyces cerevisiae*. Cílem řízeného kvašení je dosažení vína, které má výborné sensorické znaky, což je nejdůležitější při výběru vína spotřebitelem [5, 70]. Zákvas se připravuje v množství 1 % veškerého moštu namnožením vybrané rasy vinných kvasinek v malém podílu sterilního moštu [19]. Mezi tradiční kvasné nádoby patří dřevěné kádě nebo cementem obložené nádrže, nyní se používají pro kvašení nádrže z nerezavějící oceli, u kterých je možné kontrolovat teplotu. Nerezavějící ocel je neutrální co se chutě týče, je snadno čistitelná a bývá vybavena chladícími spirálami popřípadě termostatem [63]. Na začátku kvašení vzniká rozkvašený mošt, kterému se říká burčák. Tento nápoj je velmi oblíbený a to jak pro sensorické, tak dietetické vlastnosti. K ukončení kvašení dochází v době, kdy je přítomný obsah cukru v moštu zkvašen, nebo se dá také říct, že je ukončeno v době, kdy je zbytek nezkvašeného cukru minimální [5].

3.7 Školení a ošetřování révového vína

V procesu školení a zrání vína se provádí následující operace: stáčení, čiření, filtrace, scelování [2]. Asi 6 dnů po skončení hlavního kvašení by mělo dojít k ochutnání vína

a posouzení jeho jakosti. Při školení se víno dolévá takovým způsobem, aby sud byl plný po kvasnou zátku [20]. Sudy je třeba dolévat jednou až dvakrát týdně, neboť dochází k vypařování vína a ke zmenšování obsahu oxidu uhličitého [10]. Školené víno se nesmí dolévat neškoleným vínem. Teplota během školení by neměla v závislosti na ročním období kolísat. Pro bílá vína se doporučuje teplota 8 - 10 °C a pro červená vína je teplota vyšší a to 10 - 12 °C. Zároveň s teplotou je třeba udržovat relativní vlhkost v rozmezí 60 - 80 % [5]. Vína, která byla prokvašena, se postupně začínají čistit a kvasinky, které byly usmrceny, společně s kalovými částicemi sedimentují ke dnu. Stáčení vína probíhá po řádném vykvašení a po sedimentaci kalů v období listopadu až ledna [20]. Pod pojmem stáčení se rozumí odstranění usazenin od čistého vína [16]. Před stáčením je třeba zjistit, jestli víno není náchylné na hnědnutí a v případě, že k hnědnutí může docházet, je třeba provést zasíření. Červená vína, která obsahují větší množství taninu, se čistí rychleji, a proto dochází k jejich dřívějšímu stáčení na rozdíl od vín bílých [20]. Při prvním stáčení vína je třeba dbát na to, aby došlo k minimálnímu kontaktu vína se vzduchem. V opačném případě dochází ke zhoršení aromatického charakteru vína [2]. Zásadou bývá, že se má víno stočit v pravý čas, protože delším ležením vína na kvasnicích se kvalita vína snižuje. Kvasinky se rozpadají a způsobují zakalení vína, což se projevuje nepříjemnou chutí a vůní vína [10]. Vína, která jsou kyselejší se stáčí za delší dobu, protože delším ležením vína na kvasnicích se kyselost vína vlivem biologického odbourávání snižuje. To spočívá v rozkladu kyseliny jablečné na chuťově jemnější kyselinu mléčnou (jablečno - mléčné kvašení). Druhé stáčení se provádí po dokonalém vyčiření vína a to v březnu až dubnu. Révová vína je třeba před filtrací vyčistit [5]. Abychom stanovili správnou dobu druhého stáčení, tak provedeme chuťovou zkoušku, zjistíme čistotu vína a taky je možné provést zkoušku na stálost vína, která se provádí ponecháním vína ve skleničce po dobu 24 hodin [10]. Ve vinařské praxi se jako čířidla používá želatina, tanin, bentonit [20]. Pro odstranění těžkých kovů se používá modré čiření za použití hexakyanoželeznatanu draselného (žlutá krevní sůl). Dříve se ve vinařství používala čířidla jako vaječný bílek, agar, vyzina [6]. Želatina se aplikuje v množství 0,02 - 0,2 g/l a tanin v množství 0,02 g/l. Množství použitého čířidla se musí nejdříve experimentálně odzkoušet na malých množstvích vína [16]. Při scelování vín dochází k vyrovnání chuťových vlastností dvou a více vín, dochází také k úpravě barvy, obsahu alkoholu. Při scelování je nejdůležitější, aby si víno udrželo charakter dané odrůdy. Většinou dochází ke scelování vín méně výrazných s víny extraktivnějšími [20]. Ke scelování bývají používány velké

betonové nebo kovové cisterny [16]. Révová vína je možné filtrovat několikrát za sebou, ale k filtraci mohou být použita pouze vína dostatečně vyčiřená [5]. Filtrace se provádí kvůli rychlému odstranění nečistot a kalů z vína. Filtraci je možné rozdělit na hrubou a jemnou a to podle velikosti odstraňovaných částic. K hrubé filtraci se většinou používají filtry naplavovací, ve kterých se víno filtruje přes naplavovací hmotu, která byla zachycena na sítích, většinou vyrobených z drátu. Od osmdesátých let 20. století se k hrubé i jemné filtraci začaly používat křemelinové filtry. Křemelina je rozsvivková hlinka a jedná se o zbytky sladkovodních řas [6]. Proces zrání a především jeho délka závisí na charakteru vína, na chemickém složení, způsobu skladování a ošetřování. Bílá vína jsou vyzrálá již za několik měsíců. Vína, která obsahují málo kyselin a extraktu jako např. Irsai Oliver, Müller-Thurgau jsou zralá ještě dříve. Zato červená vína získávají své plné aroma a charakter po delší době zrání, většinou to bývají 2 - 3 roky [4]. Vína bývají uskladněna v dřevěných sudech, železobetonových cisternách nebo v ocelových tancích [5]. Většinou platí, že v malých a dřevěných sudech dochází ke zrání vína rychleji, než v nádobách velkých [10]. Vína, která jsou uložena v dubových sudech absorbují karamelové, kávové a kouřové tóny ze sušeného nebo vypalovaného dřeva. Dubové dřevo je bohaté na obsah glycidů a tím, že se dřevo opaluje, dochází ke vzniku sladké chuti a vůni po vanilce. Taková vína se označují jako barikovaná a proces výroby jako barikování. Za optimální velikost se udávají sudy o obsahu 225 l. Je možné používat i sudy o polovičním obsahu a nebo sudy o obsahu 600 l [6].

3.8 Lahvování vína

Lahvovat nelze vína, která ještě dokváší [5]. Lahvují se vína vyzrálá, vyškolená a taková, která nemají sklon k tvorbě zákalů. Lahvují se vína, u nichž nedochází k dodatečným změnám organoleptických vlastností [19]. Každá odrůda má specifickou dobu vhodnou pro lahvování, v lahvích víno dále dozrává. Vína, která jsou vyškolená, jsou plněna do lahví a uzavírána korkovou zátkou nebo se používá zátko z plastu. Korková zátko je vhodná z důvodu, že přes buněčné stěny korku probíhá neustálá, nepatrná výměna vzduchu, čímž se víno nadále zušlechťuje [5]. V České republice se vína plní do lahví 0,7 a 1 l, méně do lahví 0,5 a 0,3 l [19].

4 CHROMATOGRAFIE

Chromatografie je separační a současně analytická fyzikálně chemická metoda. Jedná se o metodu umožňující kvalitativní a kvantitativní analýzu vzorku [71, 72]. Chromatografické separace může být dosaženo u sloučenin, které migrují různými rychlostmi přes chromatografické dno. Migrace je založena na různém zadržení migrujících sloučenin, která je založena na procesu různého rozdělení separovaných složek mezi dvě fáze: mobilní a stacionární fázi [73]. Vzorek je umístěn na začátek stacionární fáze a pohybem mobilní fáze dochází k unášení vzorku. Složky vzorku se mohou při separaci zdržovat a to z důvodu, že jsou zachycovány stacionární fází. Takovým způsobem se složky vzorku od sebe oddělují [71, 72]. Chromatografie se velmi široce uplatňuje ve všech vědeckých odvětvích včetně lékařství.

4.1 Historie chromatografie

Základy chromatografických metod jsou známy velmi dlouho. Příkladem může být skutečnost, že sorpční vlastnosti některých zemin byly použity už v době vlády Aristotela a byly použity k čištění mořské vody [74]. Ruský botanik Cvet položil základy chromatografie a to tak, že jako první do detailu popsal separaci barviv a barevných látek filtrací přes sloupec [75]. Cvet nazval výsledek tohoto pokusu chromatogram a metodu jako chromatografickou [74]. V roce 1931 oddělili vědci Kuhn a Leder karoteny a xantofyly na předběžné koloně z hliníku a uhličitanu vápenatého a tímto procesem byly možnosti Cvetovi metody plně realizovány. V roce 1938 vědec Reichstein uvedl kapalinový chromatogram a rozšířil tak upotřebení metody na bezbarvé látky. V roce 1941 byla představena rozdělovací chromatografie na silikagelu vědci Martinem a Syngem. Papírovou chromatografii poprvé popsali vědci Consdenem, Kordonem a Martin v roce 1944 a stala se hlavní pomůckou pro biochemickou analýzu a výzkum. Iontově – výměnná chromatografie byla popsána v roce 1947. Objev chromatografie plyn – kapalina v roce 1952 otevřela nové možnosti analytické chemie a zveřejnili ji vědci James a Martin [75]. V následujícím roce se český chromatografista Janák podílel na rozvoji chromatografie plyn – tuhá látka. Počátkem roku 1956 došlo k rozšíření chromatografie na tenkých vrstvách, a to díky Stahlovi, jež už dřív tuto metodu propagoval v člancích. Metoda nazvaná gelová filtrace byla navržena v roce 1959 Parothem a Flodinem, kteří ji uskutečnili pomalou filtrací roztoků kolonami, které byly naplněny

zrnky vhodných gelů [74]. V roce 1960 byla Horvathem vyvinuta metoda vysoce účinné kapalinové chromatografie [76].

4.2 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografických metod je velké množství, proto se dělí do určitých skupin.

4.2.1 Podle skupenství mobilní fáze

- Kapalinová chromatografie, kde je mobilní fází kapalina.
- Plynová chromatografie, kde mobilní fází tvoří plyn.

4.2.2 Podle uspořádání fází

- Kolonová chromatografie, ve které je stacionární fáze umístěna v trubici.
- Plošná chromatografie, která se dále dělí na:
 - papírová chromatografie, v níž je stacionární fáze součástí chromatografického papíru
 - tenkovrstvá chromatografie, kde stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladu. Na inertní podložce (Al - folie, sklo) je nanesena vrstva pevného sorbetu [71, 72].

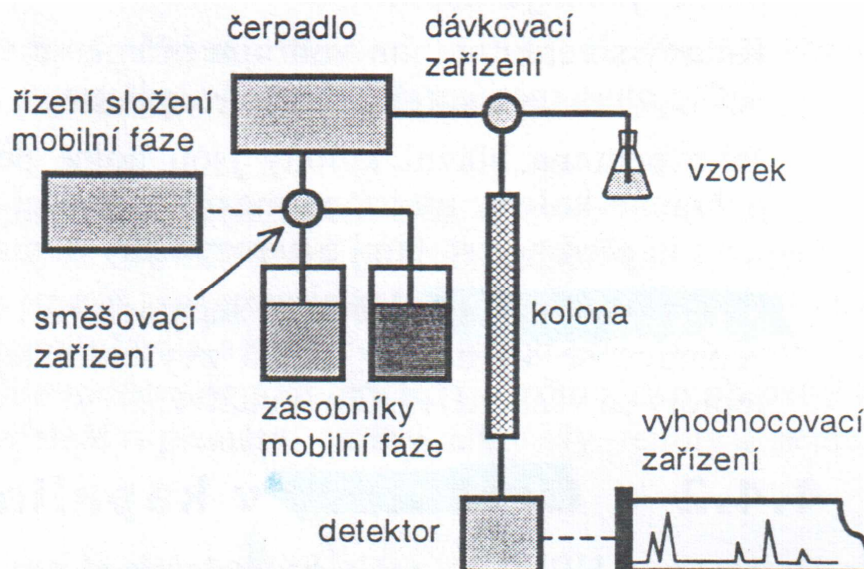
4.2.3 Podle probíhajícího děje

- Adsorpční chromatografie, ve které o separaci rozhoduje rozdílná schopnost složek poutat se na povrch stacionární fáze (tuhá látka).
- Rozdělovací chromatografie, při které o separaci rozhoduje různá rozpustnost složek vzorku ve stacionární (kapalina) a mobilní fází (kapalina, plyn).
- Iontově výměnná chromatografie, kde o separaci rozhodují různé elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze a ionty vzorku.
- Gelová chromatografie, ve které se vzorky separují podle velikosti na pórovité stacionární fází (gelu) [71, 72].

- Afinitní chromatografie, ve které má stacionární fáze schopnost ze vzorku vázat jen ty složky, ke kterým má selektivní vztah [71, 72].

4.3 Vysoce účinná kapalinová chromatografie – HPLC

HPLC byla vyvinuta z plynové chromatografie na počátku 70. let [77]. Tato metoda separuje komplexní směsi na jednotlivé sloučeniny, které jsou identifikovány a kvantifikovány pomocí vhodného detektoru a data zpracovány počítačovým systémem. Metoda se hodí pro sloučeniny omezené tepelné stability. Různé detekční techniky umožňují nejen velmi citlivou, ale také vysoce selektivní analýzu sloučenin [78]. Vysoce účinná kapalinová chromatografie se zařazuje mezi kapalinovou chromatografii. V kapalinové chromatografii tvoří mobilní fázi kapalina. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fázi. Aby separace byla účinná, je třeba použít dostatečně malá zrníčka sorbetu, tato zrníčka kladou odpor prostupující kapalině. Při této metodě je třeba pracovat při vysokém tlaku [72]. V HPLC se jako stacionární fáze používá silikagel [79]. Silikagel pro chromatografii je amorfní gel s velmi polárním povrchem [73]. Většinou převažuje použití chemicky vázaných fází. Kromě stacionární fáze se může měnit i charakter a složení mobilní fáze [79]. Mobilní fázi v HPLC tvoří voda, organické rozpouštědlo nebo čistý pufr. Tyto složky mohou být použity samostatně nebo ve směsích [80]. Většina separací probíhá při laboratorní teplotě. Ke zlepšení některých separací se použije vyšší teplota, zvýšení teploty je umožněno použitím nových chromatografů [72]. HPLC je první dělicí technika, schopná vícesložkové analýzy a tato metoda je vysoce automatizovaná [76]. Kolona v HPLC je považována za srdce systému této separace, avšak potřebné informace o vzorku můžeme získat pouze ze signálu, který vychází z detektoru [81]. Mezi výhody patří široká oblast použitelnosti. Můžeme jí analyzovat ionty, polární i nepolární látky, látky těkavé a tepelně nestabilní [77].



Obrázek 18 – Schéma kapalinového chromatografu [72]

4.3.1 Čerpadla

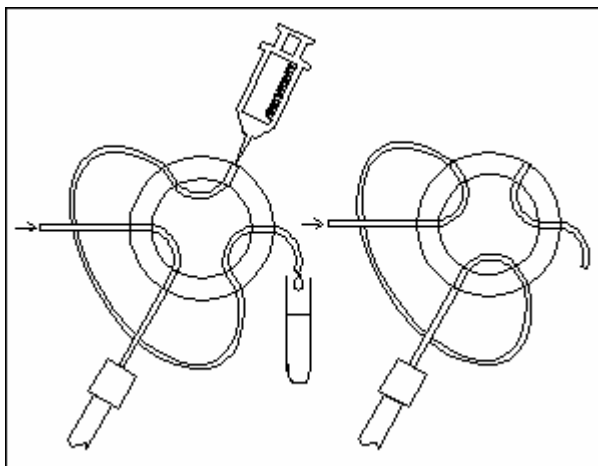
Funkce čerpadla v HPLC je průchod mobilní fáze kolonou, o kontrolovaném průtoku. Tlak potřebný k dosažení požadovaného průtoku v HPLC je takový, že nedojde k překročení 150 – 200 bar. Většina čerpadel pracuje s mnohem vyššími tlaky [82]. Materiál, ze kterého je čerpadlo vyrobeno (nerezová ocel, keramika, plast, safír, rubín) nesmí být porušen mobilní fází a nesmí do ní uvolňovat žádné látky. Místo čerpadla je možné použít injekční stříkačku, která je naplněná mobilní fází a jedná se o levnější alternativu [72, 80]. Čerpací systémy jsou klasifikovány podle toho, jak dochází k míšení rozpouštědel [76]. Hlavní kategorie čerpadel používaných v HPLC jsou pneumatická čerpadla, poháněná injekční čerpadla, pístové pumpy a pístová čerpadla [83].

4.3.2 Směšovací zařízení

Složení mobilní fáze se může během separace měnit, ale také může zůstat nepozměněno. Pokud se směšovací zařízení naprogramuje, může za použití zásobníků různých kapalin připravit směs kapalin stálého složení nebo může řídit změny ve složení výsledné mobilní fáze během separace [72].

4.3.3 Dávkovací zařízení

Dávkovací zařízení umožňuje zavedení vzorku do kolony pod vysokým tlakem, bez přerušování toku rozpouštědla [84]. K dávkování vzorku je možno použít kohout (ventil), který je opatřen dávkovací smyčkou (μl), která se naplňuje mikrostříkačkou [71]. Injekční stříkačkou se naplní dávkovací kapilára tak, aby se nepřerušil průtok mobilní fáze do kolony. Když se otočí jádro, tak se dávkovací kapilára zařadí do průtoku a vzorek se z něj mobilní fází vytlačí do kolony. Zpětným otočením jádra se dávkovací kohout vrátí do původní polohy [85]. Pokud se dávkuje pomocí stříkačky, tak dochází k řadě nevýhodám. Mezi ně patří nevhodná těsnost, udržení tlaku a hlavně k vnášení stop materiálu injekční stříkačky. Injekční zařízení musí být vyrobeno z inertního materiálu, jako je např. nerezová ocel, polymery [72].



Obrázek 19 – Dávkovací zařízení [86]

4.3.4 Kolony

Kolony pro HPLC jsou vyrobeny z materiálu, který je odolný proti vysokému tlaku (až 60 MPa). Jsou vyrobeny z borosilikátového tvrzeného skla nebo z antikoroziční oceli [67]. Kolony pro HPLC jsou obvykle 10 – 30 cm dlouhé a v průměru mají 3 – 10 mm, přičemž větší kolony se používají pro preparativní práci [84]. Kolony bývají plněny sorbenty obsahující částice o velikosti 3 – 10 μm . Průtok eluentu je 1 – 2 ml za minutu. Hlavní kolona bývá chráněna použitím tzv. předkolony, která bývá umístěna mezi čerpadlo a dávkovací zařízení nebo se používá ochranná kolona, umístěna mezi dávkovací zařízení a analytickou kolonu [72].



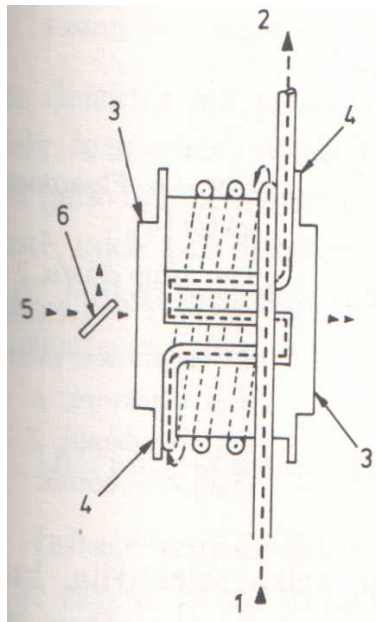
Obrázek 20 – Chromatografická kolona [87]

4.3.5 Detektory

Chromatografický detektor je zařízení, které slouží k indikaci přítomnosti vzorku nebo ke kvantitativnímu sledování koncentrace vzorku v eluátu [85]. Detektor by měl co nejméně přispívat k rozšíření eluční křivky a to z důvodu, aby nedošlo ke zhoršení separační účinnosti kolony. Mrtvý objem detektoru by měl být co nejmenší (μl), spojovací cesty k detektoru by měly být co nejkratší a nemělo by v nich docházet k zadržování eluátu [88]. Detektor je limitujícím prvkem kapalinové chromatografie. Měl by být selektivní pro analyty a málo citlivý na mobilní fázi. Detektorů je velké množství a dělí se na optické (spektrofotometrický, fluorimetrický, refraktometrický, hmotnostní) a elektrochemické (vodivostní) [71, 72]. Signál detektoru se vyhodnocuje počítačem nebo pomocí jiného vyhodnocovacího zařízení [77].

4.3.5.1 Fotometrické detektory

Tyto detektory patří k nejpoužívanějším v HPLC, protože jsou jednoduché, provozně spolehlivé, slouží k detekci mnoha látek [79]. Fotometrické detektory jsou založené na měření změn intenzity světla, způsobené vymýváním vzorku [85] Tyto detektory měří absorbanci eluátu, který vychází z kolony. Jednodušší detektory měří při jedné vlnové délce v ultrafialové oblasti, složitější umožňují nastavení vlnové délky pomocí monochromatoru. Citlivost tohoto detektoru je pro různé látky různá [72]. K detekci bývá využívána ultrafialová, viditelná i infračervená oblast. Tyto detektory mají malý šum, většinou nevykazují drift základní linie a limit detekce je obvykle malý (desítky až desetiny nanogramů) [88].

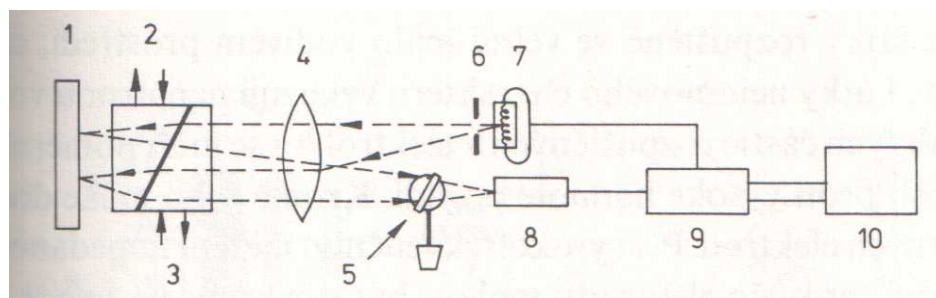


Obrázek 21 – Fotometrický detektor [88]

1 – vstup eluátu, 2 – výstup eluátu, 3 – okénko, 4 – těsnicí kroužky, 5 – světelný paprsek, 6 - zrcátko

4.3.5.2 Refraktometrické detektory

Detektory měří rozdíl mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Protože jsou tyto rozdíly malé, je refraktometrický detektor považován za málo citlivý. Při jeho použití se musí přísně dodržovat konstantní teplota [72, 77]. Na rozdíl od fotometrických detektorů jsou tyto detektory považovány za univerzální [85].

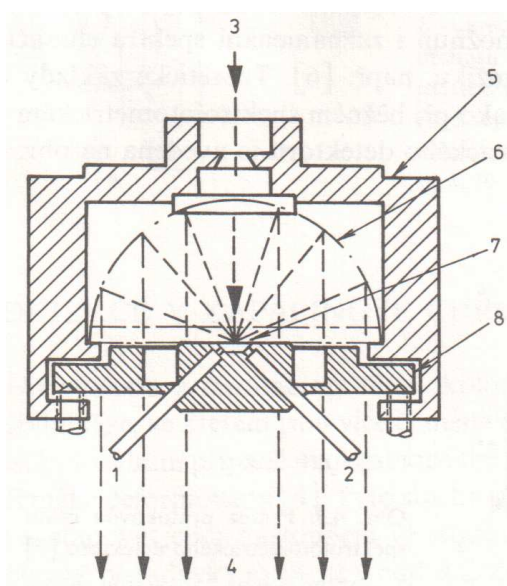


Obrázek 22 – Refraktometrický detektor [88]

1 – zrcadlo, 2 – cela se vzorkem, 3 – referenční cela, 4 – čočka, 5 – nastavení optické nuly, 6 – clona, 7 – zdroj světla, 8 – detektor (fotocela), 9 – zesilovač a zdroj, 10 - zapisovač

4.3.5.3 Fluorimetrické detektory

Detektor je založen na principu fluorescence, což znamená, schopnost látek absorbovat ultrafialové záření a poté vydávat záření o vyšší vlnové délce. Toto vydané záření je měřeno fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření [72]. Mobilní fáze nesmí obsahovat fluoreskující látky, ani látky, které fluorescence zhasí [88]. Sloučeniny, které nejsou přirozeně fluoreskující, mohou po reakci se zvláštním činidlem tvořit fluoreskující produkt. Fluorescenční detektory mají obecně detekční limity, které jsou 100krát až 1000krát nižší než u standardních UV detektorů [84].



Obrázek 23 – Fluorimetrické detektor [88]

1 – vstup eluátu, 2 – výstup eluát, 3 – excitující záření, 4 – emitované záření,
5 – těleso detektoru, 6 – optika, 7 – kyveta, 8 – nosník

4.3.5.4 Elektrochemické detektory

Elektrochemické detekční techniky jsou založeny na přenosu elektrického náboje, ke kterému dochází, když jsou elektrony v molekule při oxidaci vzdalovány nebo absorbovány molekulou při redukci. Tato oxidace nebo redukce probíhá na povrchu takzvané pracovní elektrody. Zda je směs redukována nebo se oxiduje, záleží na potenciálním rozdílu mezi pracovní elektrodou a roztokem obsahujícím sloučeniny. Při detekci se používají 3 typy elektrod : pracovní elektroda, ve které probíhá reakce, zpětná elektroda, která určuje potenciální rozdíl mezi mobilní fází a pracovní elektrodou a referenční elektroda, která kompenzuje změny vodivosti elučního roztoku. Přestože

elektrochemická detekce může objevit jen ty látky, které mohou být elektrolyzovány, tak toto omezení má výhodu při použití na složitou potravinovou matici, protože zlepšuje selektivitu. Materiály používané pro pracovní elektrody jsou skelný uhlík, zlato (na cukry a alkoholy), platina, měď aj. [78]. ECD využívá dva typy detekce. Jako první typ můžeme uvést amperometrický detektor, ve kterém teče eluent po povrchu elektrody. Směs tekoucí po povrchu elektrody obsahuje elektroaktivní prvky, které s touto elektrodou téměř nereagují. Pouze 5 – 15 % elektroaktivních látek s těmito elektrodami reaguje [89]. Druhým typem je coulometrický detektor, jehož principem je měření náboje v kulometrické nádobce, kterou protéká eluát a děje se to při konstantním napětí. Výhodou tohoto typu detektoru je, že účinnost elektrochemického děje se blíží jedné a z tohoto důvodu nemusíme detektor kalibrovat na kvantitativní měření. Jako další výhodu můžeme zmínit to, že změny rychlosti průtoku a teploty neovlivní výsledky analýzy [72]. Tyto detektory získávají na významu, protože mají široký dynamický rozsah a jsou citlivé pro určité skupiny látek [88].

4.3.6 Vyhodnocovací zařízení

Výsledkem měření je chromatogram s příslušným píkem, jehož plocha je přímo úměrná koncentraci stanovované kyseliny [72].

5 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce v teoretické části, bylo popsat kyselinu vinnou, citronovou, jablečnou, mléčnou, octovou a jantarovou, které jsou přítomny ve víně, dále uvést některé způsoby, kterými se zmíněné organické kyseliny dají stanovit a detailněji popsat vysoce účinnou kapalinovou chromatografii s elektrochemickým detektorem. Cílem diplomové práce v praktické části, bylo touto metodou stanovit kyselinu vinnou, citronovou, jablečnou, mléčnou, octovou a jantarovou v poskytnutých vzorcích vín, které se staly šampióny soutěže Král vín České republiky 2009.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 Analyzovaný materiál

Pro praktické zkoumání bylo použito 22 vzorků vín. Vína pocházela z vinařské soutěže Král vín České republiky 2009 a jsou to nejlépe hodnocené vzorky. Vína byla různého obsahu cukru, ethanolu, ročníku a pocházela z různých podoblastí Čech i Moravy. Jednotlivé vzorky tedy byly následující:

- **CABERNET MORAVIA**, odrůdové červené víno, suché, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast znojemská, vinařská obec Horní Dunajovice, 2005, 12,0 % obj
- **CABERNET SAUVIGNON**, růžové víno s přívlastkem, pozdní sběr, suché, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast mikulovská, vinařská obec Mikulov, 2008, 13,0 % obj
- **CUVÉE**, jakostní víno, Kolby a.s. Pouzdřany, 2008
- **FANTOMME CUVÉE**, víno odrůdové, polosladké, směs vín – Cabernet Sauvignon, Merlot a Rulandské modré, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast mikulovská, vinařská obec Drnholec, 2007, 11,5 % obj
- **FRANKOVKA**, jakostní víno s přívlastkem, pozdní sběr, suché, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast velkopavlovická, vinařská obec Čejkovice, 2008, 12,5 % obj
- **FRANKOVKA BARRIQUE**, jakostní víno s přívlastkem, výběr z hroznů, polosuché, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast velkopavlovická, Chateau Strážnice, 2006, 14,0 % obj
- **CHARDONNAY**, jakostní víno s přívlastkem, pozdní sběr, suché, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast mikulovská, vinařská obec Pavlov, 2008, 12,8 % obj
- **LANGEWARTE CUVÉE** – Ryzlink rýnský, Nové vinařství, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast mikulovská, 2005, 11,5 % obj

- **MERLOT ROSÉ**, víno s přívlastkem, pozdní sběr, polosladké, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast znojemská, vinařská obec Dolní Kounice, 2008, 12,0 % obj
- **MODRÝ PORTUGAL**, jakostní víno s přívlastkem, pozdní sběr, suché, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast velkopavlovická, vinařská obec Kobyly, 2007, 12 % obj
- **NERONET**, moravské zemské víno, panenská sklizeň, suché, Čejkovice, 2007, 13,0 % obj
- **PETRONILLA VINUM PRIMAEVUM**, perlivé víno, přírodní polosladké, tradiční metoda dokvašování v lahvi, vinařství Proqin, František Prokeš, 10 % obj
- **RULANDSKÉ BÍLÉ**, Moravské zemské víno, suché, Svatobořice – Místřín, 2008, 12,5 % obj
- **RULANDSKÉ BÍLÉ**, jakostní víno s přívlastkem, pozdní sběr, polosuché, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast mikulovská, vinařská obec Valtice, 2008, 13,0 % obj
- **RULANDSKÉ BÍLÉ**, jakostní víno s přívlastkem, výběr z hroznů, sladké, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast slovácká, vinařská obec Kyjov, 2007, 11,5 % obj
- **RULANDSKÉ MODRÉ**, jakostní víno s přívlastkem, výběr z hroznů, vinařství Štěpán Maňák, Žadovice, 2008
- **RULANDSKÉ ŠEDÉ**, jakostní víno s přívlastkem, výběr z hroznů, polosladké, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast mikulovská, vinařská obec Mikulov, 2008, 12,5 % obj
- **RYZLINK RÝNSKÝ**, víno s přívlastkem, ledové víno, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast znojemská, 2008, 9,5 % obj
- **RYZLINK VLAŠSKÝ**, jakostní víno s přívlastkem, pozdní sběr, Kolby a.s. Pouzdřany, 2007

- **TRAMÍN**, jakostní víno s přívlastkem, pozdní sběr, suché, vinařská oblast Čechy, vinařská podoblast litomeřická, 2007, 12,5 % obj
- **TRAMÍN ČERVENÝ**, jakostní víno s přívlastkem, pozdní sběr, polosuché, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast znojemská, vinařská obec Jasovice, 2008, 12,5 % obj
- **VETLÍNSKÉ ZELENÉ**, jakostní víno s přívlastkem, ledové víno, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast mikulovská, vinařská obec Rakvice, 2008, 9 % obj

6.2 Chemikálie

H₂SO₄ byla zakoupena od firmy Aldrich Corporation, (USA). Methanol použitý na přípravu roztoku na čištění kolony HPLC, byl zakoupen u firmy Sigma Aldrich, (Germany). Standardy kyseliny jablečné, vinné, mléčné, citronové, octové, jantarové byly dodány firmou Sigma Aldrich, (Germany). Používaná redestilovaná voda byla vyrobena v destilačním přístroji IDPE (8 – 18 N), který byl zakoupen u firmy Vitrum.

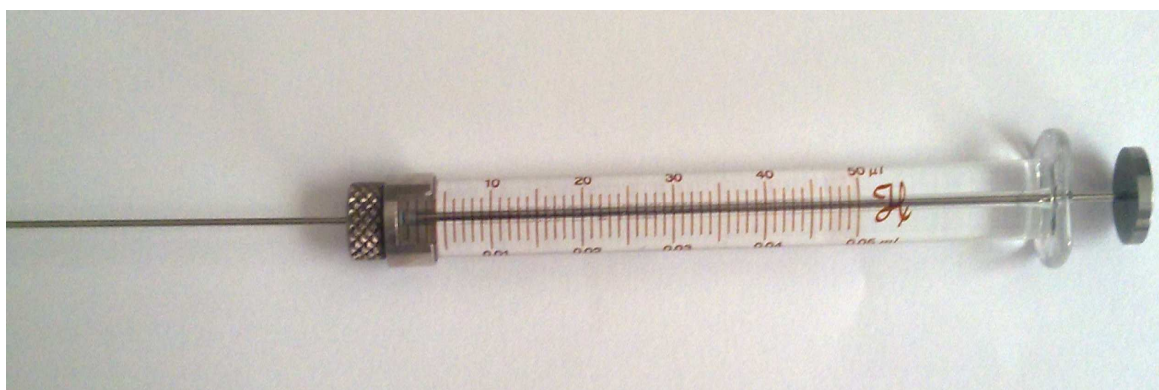
6.3 Přístroje a zařízení

Navážení standardů kyselin bylo provedeno na digitální analytické váze AFA/LC od výrobce Schoeller instruments, (ČR-Praha). Standardy kyselin, mobilní fáze a ostatní použité chemikálie byly uloženy v lednici značky Whirlpool. Pro přesné odměření standardů kyselin a vzorků, byly použity automatické mikropipety o objemu 10 – 1000 µl zakoupené u firmy BIOHIT PLC, (Finsko). Vzorky vín, které byly použity k analýze se nechaly odplynit za použití ultrazvuku, který vyrábí firma Kraitek, (ČR). Po odplynění byly vzorky destilovány za pomoci modifikované Hortvet – Sellier destilační aparatury, která byla zakoupena u firmy Fischer s.r.o., (Slovensko). Připravená mobilní fáze byla přefiltrována přes speciální filtrační aparaturu (Fischer Scientific, ČR). Byl použit filtr o velikosti 0,2 µm (Supelco, USA). K nadávkování předestilovaného vzorku vína do HPLC aparatury, byla použita speciální stříkačka (Hamilton, USA). K samotné analýze byla použita aparatura HPLC, konkrétně se jednalo o přístroj Coulochem III s elektrochemickým detektorem (ESA, USA), dále aparatura obsahovala analytickou celu 5010A, guard celu 5020, kolonu AMINEX HPX-87H (300 x 7,8 mm; Bio Rad spol. s.r.o.,

ČR). Vzorokly byly ručně nastříknuty do dávkovacího ventilu, který byl opatřen dávkovací smyčkou o objemu 20 μl . Pro vyhodnocení byla použita počítačová sestava vybavená speciálním vyhodnocovacím programem ChemStation – Instrument 1 (Agilent, USA).



Obrázek 24 – Chromatograf HPLC, na kterém byla provedena analýza



Obrázek 25 – Stříkačka Hamilton

6.4 Stanovení standardů organických kyselin – FIA detekce

Bylo provedeno měření bez kolony (FIA detekce), tzv. průtoková analýza. Nástřik standardů kyseliny vinné, jablečné, citronové, mléčné, octové a jantarové byl proveden přímo na detektor a to z důvodu, abychom zjistili, zda detektor na tyto organické kyseliny reaguje. Detektor pozitivně reagoval na koncentrace kyselin, které byly dále použity pro všechna měření.

6.5 FIA detekce a sken napětí

Na elektrody bylo postupně vkládáno různé napětí, od 100 mV do 850 mV, po 50 mV intervalech a byl sledován vliv napětí na elektrodách na odezvu detektoru.

6.6 Zjištění retenčních časů organických kyselin

Pro zjištění retenčních časů kyseliny vinné, jablečné, citronové, mléčné, octové, jantarové bylo provedeno měření standardů jednotlivých kyselin za stejných chromatografických podmínek jako je uvedeno v kapitole 7.2.

6.7 Vliv koncentrace organických kyselin na odezvu detektoru

Kyseliny byly v koncentracích 10 mg/l, 30 mg/l, 50 mg/l, 70 mg/l, 90 mg/l, 100 mg/l, 300 mg/l, 500 mg/l, 700 mg/l, 900 mg/l, 1000 mg/l nastříknuty na kolonu a byla pozorována odezva detektoru na jednotlivé koncentrace. Z výsledků byl sestaven sken koncentrací ve dvou kalibračních řadách. První v intervalu koncentrací 10 – 100 mg/l, druhá v intervalu koncentrací 100 – 1000 mg/l.

6.8 Analýza v přítomnosti biologické matrice

6.8.1 Podmínky chromatografie pro samotnou analýzu

Pro stanovení vybraných organických kyselin v poskytnutých 22 vzorcích vín, byla jako mobilní fáze použita 1,58 mM H_2SO_4 připravená zředěním činidla redestilovanou vodou a filtrována přes membránový filtr a eluce probíhala izokraticky [54]. Rychlost průtoku byla 1,0 ml/min, detektor byl temperován na 30 °C a napětí vložené na ochrannou guard celu bylo 950 mV.

6.8.2 Příprava vzorků před destilací

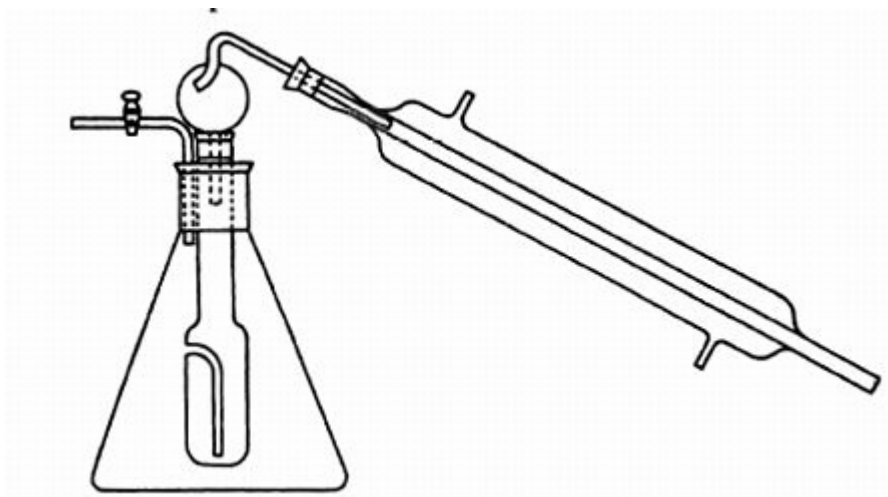
Odměrná baňka o objemu 50 ml byla předem zvážena na analytických vahách a následně byla naplněna 50 ml vychlazeného vzorku vína. Takto naplněná baňka byla umístěna na 10 minut do ultrazvuku a po uplynutí této doby, byl vzorek destilován.

6.8.3 Destilace vzorku

Jako destilace se označuje metoda, při které dochází k oddělování kapalných látek na základě různého bodu varu. Pokud dochází k zahřívání dvousložkové směsi, tak do plynné fáze přechází těkavější složky [90].

Destilace byla provedena na modifikované Hortvet – Sellier destilační aparatuře. Do předem vyhřáté baňky destilačního přístroje bylo nalito 50 ml vzorku vína. Destilací se ze vzorku získalo 50 ml destilátu. Takto získaný destilát byl promíchán a napipetován do dvou plastových zkumavek. Obsah zkumavek byl použit pro samotnou analýzu na kapalinovém chromatografu – Coulochem III.

Obrázek modifikované Hortvet – Sellier destilační aparatury je uveden v příloze III.



Obrázek 26 – Modifikovaná Hortvet - Sellier destilační aparatura [91]

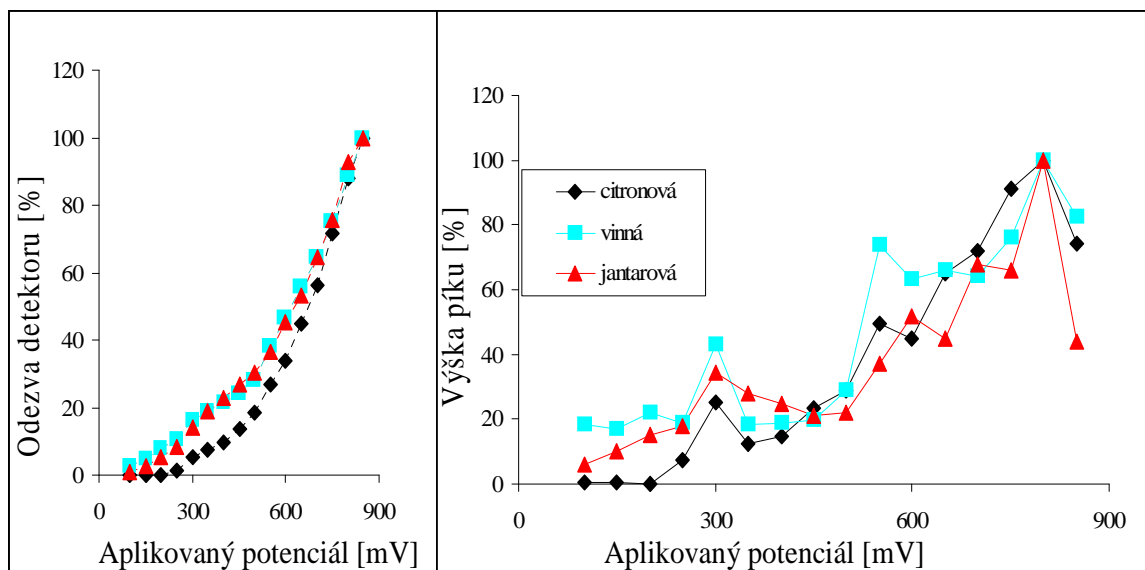
7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 FIA detekce standardů organických kyselin

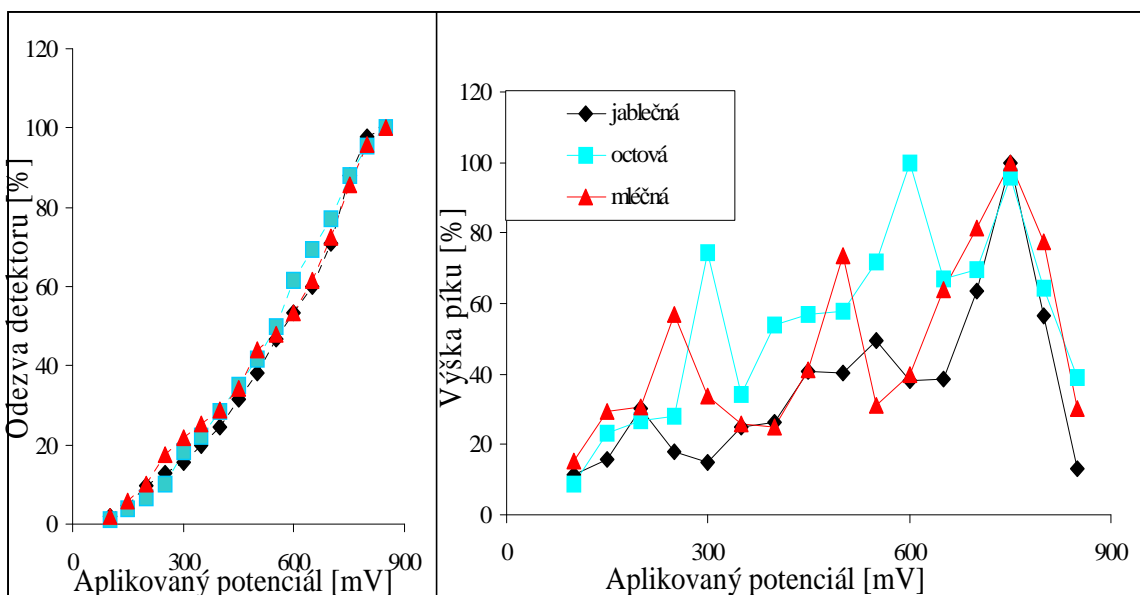
Byla sledována odezva detektoru na standardy jednotlivých organických kyselin. Detektor reagoval pozitivně na kyselinu vinnou o koncentraci 100 mg/l, jablečnou o koncentraci 100 mg/l, citronovou o koncentraci 1 g/l, octovou o koncentraci 100 mg/l, mléčnou o koncentraci 100 mg/l a jantarovou o koncentraci 10 mg/l.

7.2 Vliv napětí na odezvu detektoru

Abychom mohly nalézt nejcitlivější a nejpřesnější podmínky pro stanovení zjišťovaných organických kyselin, musíme nejdříve nalézt optimální odpověď elektrochemického detektoru. Při měření byla použita izokratická eluce mobilní fáze, v našem případě se jednalo o 1,58 mM H₂SO₄. Tato mobilní fáze byla vybrána po prostudování literatury, ve které byla používána podobná mobilní fáze [54]. Mobilní fázi bylo upraveno pH podle použitelného přístrojového vybavení. Průtok byl zvolen 1 ml/min, kolona i detektor byly temperovány na 30 °C a objem nástřiku byl 20 µm. Na elektrody elektrochemického detektoru bylo postupně vkládáno napětí od 100 do 850 mV, po 50 mV intervalech. Výsledkem byly hydrodynamické voltamogramy organických kyselin, které měly tři pozorovaná maxima okolo 300, 600 a 800 mV, což je patrné v grafu 1, 2. Ze získaných experimentálních výsledků byl jako nejvhodnější vybrán potenciál 800 mV, při němž došlo k rychlému nárůstu a poklesu napětí na elektrodách. Zvolený potenciál se posléze využil při analytickém stanovení organických kyselin. Naměřené výsledky byly porovnány s literaturou a zjištěná data jsou srovnatelná [92].

Graf 1 – Vliv napětí na odezvu detektoru kyseliny vinné, citronové, jantarové

Hydrodynamické HPLC – ED voltamogramy kyseliny vinné, citronové, jantarové a závislost výšky píku na použitém potenciálu za podmínek: koncentrace kyseliny vinné 100 mg/l, citronové 1 g/l, jantarové 10 mg/l, kolona AMINEX HPX – 87 H (300 x 7,8 mm; Bio Rad spol. s.r.o., ČR), izokratická eluce, mobilní fáze 1,58 mM H₂SO₄, velikost průtoku 1 ml/min, kolona a detektor temperovány na 30 °C, nástřik 20 µl. Výška píku kyseliny vinné, citronové, jantarové při potenciálu 800 mV odpovídá 100 %.

Graf 2 – Vliv napětí na odezvu detektoru kyseliny jablečné, octové, mléčné

Hydrodynamické HPLC – ED voltamogramy kyseliny jablečné, octové, mléčné a závislost výšky píku na použitém potenciálu za podmínek: koncentrace standardů kyseliny jablečné,

octové, vinné 100 mg/l, kolona AMINEX HPX – 87 H (300 x 7,8 mm; Bio Rad spol. s.r.o., ČR), izokratická eluce, mobilní fáze 1,58 mM H₂SO₄, velikost průtoku 1 ml/min, kolona a detektor temperovány na 30 °C, nástřik 20 µl. Výška píku kyseliny jablečné, octové, mléčné při potenciálu 800 mV odpovídá 100 %.

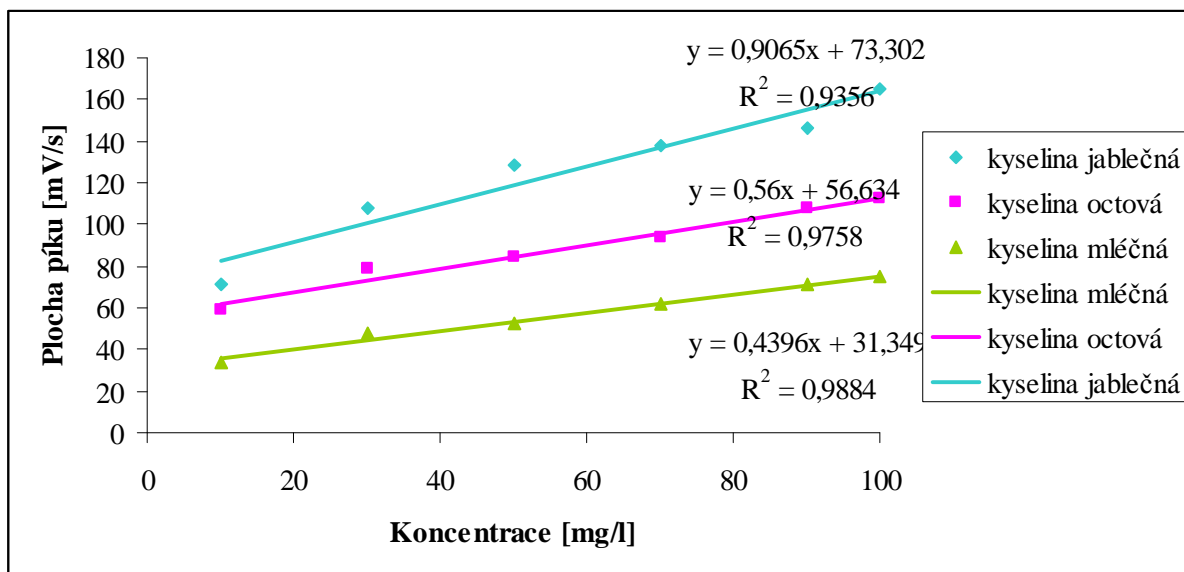
7.3 Zjištění retenčních časů kyselin

Po nástřiku standardů organických kyselin na kolonu, byly stanoveny retenční časy, odpovídající jednotlivým kyselinám. Retenční čas kyseliny vinné byl stanoven na hodnotu 5 min, jablečné 5,5 min, citronové 4,7 min, mléčné 11 min, octové 11,7 min, jantarové 4,2 min.

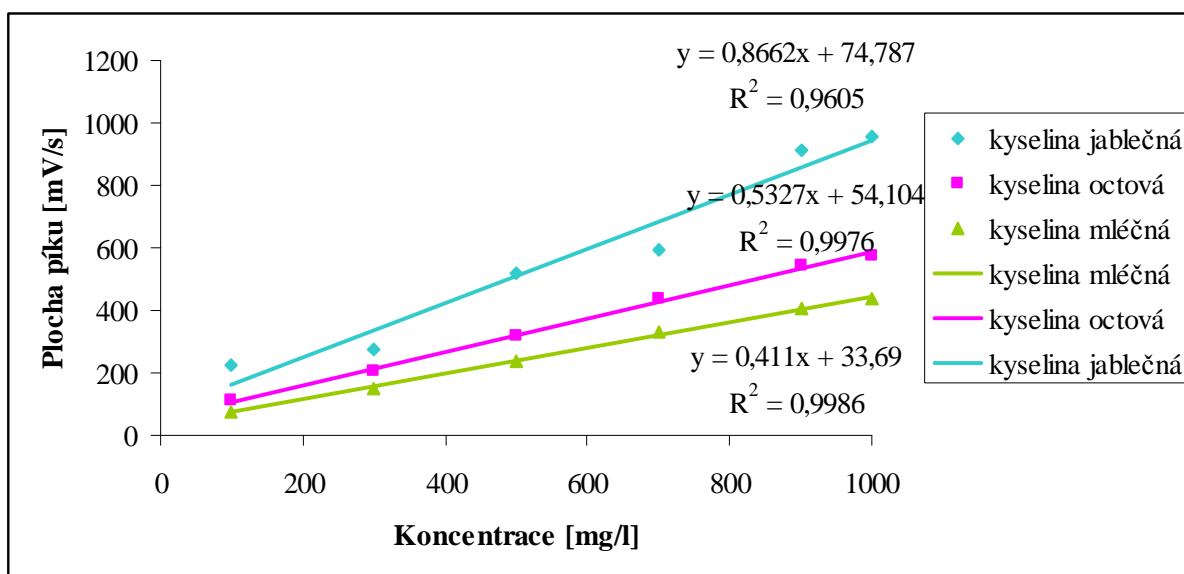
7.4 Vliv koncentrace na odezvu detektoru

Byly vytvořeny kalibrační křivky závislosti plochy píku (mV/s) na koncentraci kyselin (mg/l). Výsledky kalibrace kyseliny jablečné, octové, mléčné při koncentracích 10 mg/l až 100 mg/l jsou uvedeny v grafu 3. V grafu 4 jsou uvedeny výsledky kalibrace kyseliny jablečné, octové, mléčné při koncentracích 100 mg/l až 1000 mg/l. Kalibrační křivky pro kyseliny o koncentracích 10 - 100 mg/l byly lineární a rovnice lineární regrese pro kyseliny byly následující: kyselina jablečná: $y = 0,9065x + 73,302$, $R^2 = 0,9356$; kyselina octová: $y = 0,56x + 56,634$, $R^2 = 0,9758$; kyselina mléčná: $y = 0,4396x + 31,349$, $R^2 = 0,9884$. Kalibrační křivky pro kyseliny o koncentracích 100 - 1000 mg/l byly lineární a rovnice lineární regrese pro kyseliny byly následující: kyselina jablečná: $y = 0,8662x + 74,787$, $R^2 = 0,9605$; kyselina octová: $y = 0,5327x + 54,104$, $R^2 = 0,9976$; kyselina mléčná: $y = 0,411x + 33,69$, $R^2 = 0,9986$. U všech stanovených kyselin byla vidět lineární závislost do určité koncentrace a při vyšších koncentracích odezva detektoru rostla jen minimálně. U rovnic lineární regrese se liší směrnice rovnic, proto je použití tohoto intervalového rozdělení koncentrací při tvorbě kalibračních závislostí správné.

Graf 3 – Závislost plochy píku na koncentraci kyseliny jablečné, octové, mléčné v rozmezí 10 – 100 mg/l



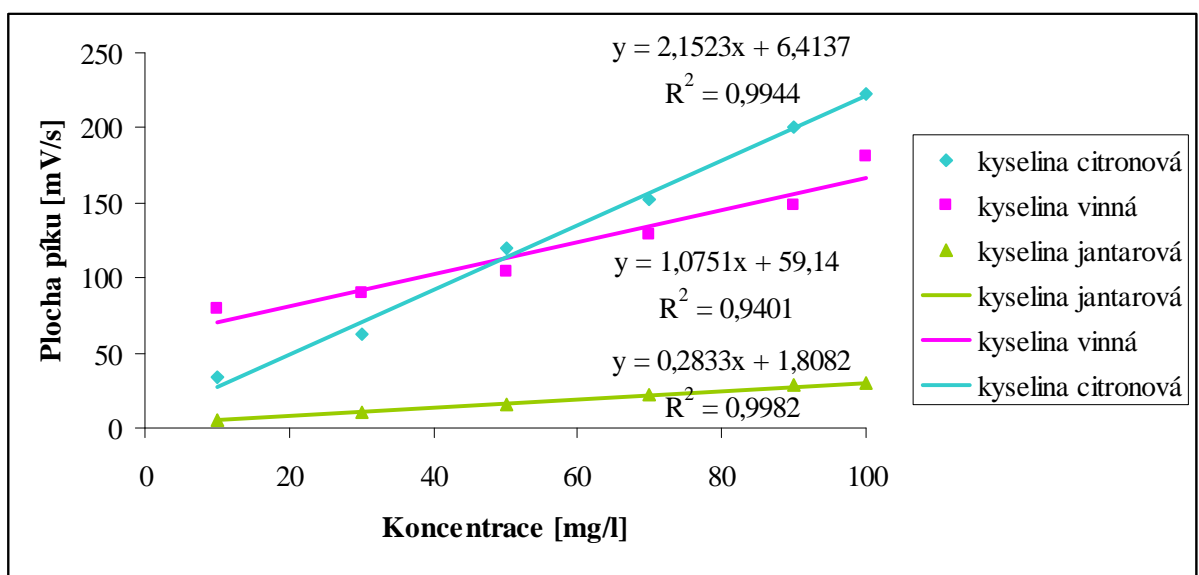
Graf 4 - Závislost plochy píku na koncentraci kyseliny jablečné, octové, mléčné v rozmezí 100 – 1000 mg/l



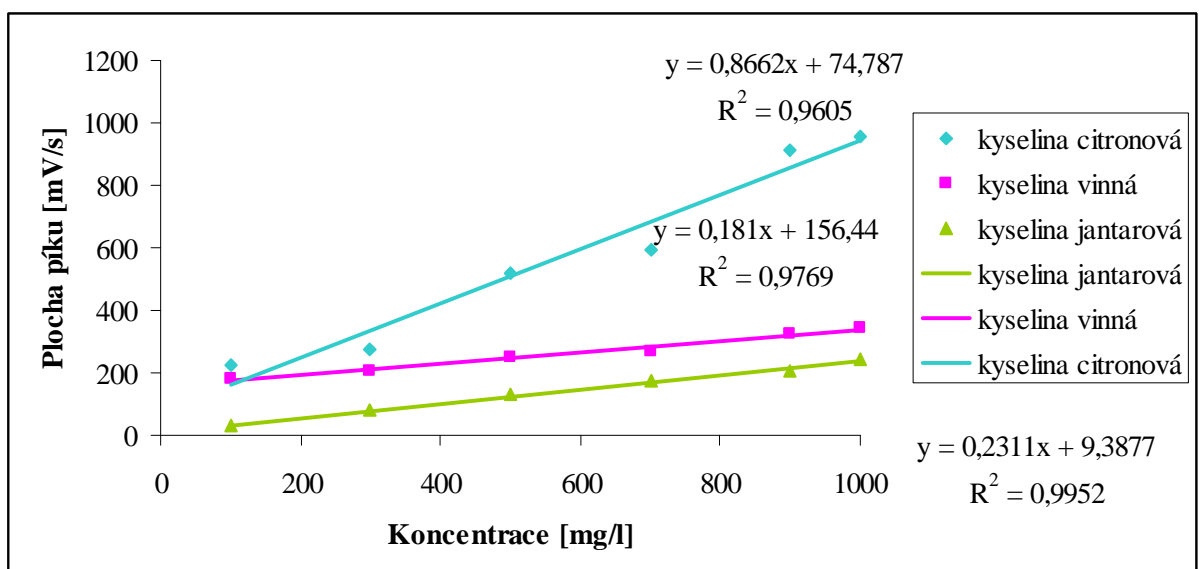
V grafu 5 jsou patrné naměřené kalibrační závislosti kyseliny citronové, vinné, jantarové o koncentracích 10 mg/l až 100 mg/l a v grafu 6 jsou uvedeny kalibrační závislosti kyseliny citronové, vinné, jantarové o koncentracích 100 mg/l až 1000 mg/l. Kalibrační křivky pro kyseliny o koncentracích 10 - 100 mg/l byly lineární a rovnice lineární regrese pro kyseliny byly následující: kyselina citronová: $y = 2,1523x + 6,4137$, $R^2 = 0,9944$; kyselina vinná: $y = 1,0751x + 59,14$, $R^2 = 0,9401$; kyselina jantarová: $y = 0,2833x +$

1,8082, $R^2 = 0,9982$. Kalibrační křivky pro kyseliny o koncentracích 100 - 1000 mg/l byly lineární a rovnice lineární regrese pro kyseliny byly následující: kyselina citronová: $y = 0,8662x + 74,787$, $R^2 = 0,9605$; kyselina vinná: $y = 0,181x + 156,44$, $R^2 = 0,9769$; kyselina jantarová: $y = 0,2311x + 9,3877$, $R^2 = 0,9952$. U všech stanovených kyselin byla vidět lineární závislost do určité koncentrace a při vyšších koncentracích odezva detektoru rostla jen minimálně.

Graf 5 – Závislost plochy píku na koncentraci kyseliny citronové, vinné, jantarové v rozmezí 10 – 100 mg/l



Graf 6 - Závislost plochy píku na koncentraci kyseliny citronové, vinné, jantarové v rozmezí 100 – 1000 mg/l



7.5 Analýza v přítomnosti biologické matrice

Podle získaných výsledků, byla námi provedená analýza pro zjišťování organických kyselin ve víně, určena jako použitelná, provedená separace byla dostatečná a zvolený elektrochemický detektor byl stanoven jako kvalitní pro tuto analýzu. Podle kalibračních závislostí byly vyhodnoceny výsledky měření reálných vzorků a souhrnné výsledky zobrazuje tabulka 3.

Tabulka 3 – Koncentrace kyselin ve vzorcích vín [g/l]

	kyselina vinná	kyselina jablečná	kyselina citronová	kyselina mléčná	kyselina octová	kyselina jantaro- vá
FRANKOVKA BARRIQUE 2006	3,68	1,17	0,16	1,29	0,91	0,067
MODRÝ PORTUGAL 2007	1,91	0,48	0,12	1,43	0,81	0,066
NERONET 2007	2,81	1,28	0,17	1,63	0,76	0,068
RULANDSKÉ BÍLÉ 2008	1,66	0,68	0,04	1,66	0,85	0,068
CHARDONNAY 2008	1,96	0,98	0,09	1,33	0,92	0,07
RULANDSKÉ BÍLÉ 2008	2,42	1,10	0,09	1,72	0,93	0,065
CUVÉE 1244	2,47	1,10	0,07	1,50	0,93	0,066
FRANKOVKA 2008	3,79	0,81	0,07	1,77	0,91	0,066
FANTOMME CUVÉE	2,78	1,08	0,10	1,80	0,93	0,067
RULANDSKÉ ŠEDÉ 2008	3,24	1,35	0,13	2,91	0,95	0,07
CABERNET MORAVIA 2005	1,92	0,70	0,23	1,35	0,96	0,07
RULANDSKÉ MODRÉ 2008	4,03	0,54	0,27	2,31	0,94	0,071
LANGE´ WARTE CUVÉE 2007	3,73	1,11	0,07	2,45	0,95	0,068
MERLOT ROSÉ 2008	3,36	0,83	0,10	1,41	1,15	0,067
TRAMÍN ČERVENÝ 2008	2,43	0,93	0,14	1,14	0,88	0,068
RULANDSKÉ BÍLÉ 2007	4,07	1,24	0,13	1,53	0,80	0,069
TRAMÍN 2007	3,94	1,01	0,12	1,47	0,92	0,067
RYZLINK RÝNSKÝ 2008	4,34	1,39	0,08	1,89	0,93	0,064
CABERNET SAUVIGNON 2008	2,33	1,08	0,15	1,75	0,95	0,067
RYZLINK VLAŠSKÝ 2007	3,62	1,10	0,09	1,64	1,03	0,068
VELTÍNKÉ ZELENÉ 2008	3,70	1,19	0,12	2,56	0,86	0,067
PETRONILLA	2,15	1,12	0,13	1,33	0,84	0,069

Podle literatury [93] by měl být obsah organických kyselin, především kyseliny vinné, jablečné a mléčné ve vínech v rozmezí 5 – 6 g/l. Námi zjištěné výsledky jsou v rozmezí tohoto limitu, dokonce ho ani nedosahují. To může být způsobeno nedostatečným množstvím kyselin v hroznech nebo nedostatečným vyzráním vína. Nejvyšší naměřené množství kyseliny vinné bylo zjištěno u vzorku Ryzlink rýnský, ročník 2008 a hodnota byla 4,34 g/l. V tom samém vzorku byl i nejvyšší obsah kyseliny jablečné a to 1,39 g/l. Ve vzorku vína Rulandské šedé, ročník 2008, bylo stanoveno nejvyšší množství kyseliny mléčné, 2,91 g/l. Podle literatury [93] by měl být obsah těkavých kyselin, především kyseliny octové, ve vínech v rozmezí 0,2 – 0,6 g/l. U všech námi zkoumaných vzorků bylo naměřeno vyšší množství kyseliny octové, než udává literatura. Literatura dále uvádí, že je-li obsah kyseliny octové vyšší jak 1,4 g/l, je nutno víno co nejdříve zkonzumovat. Nejbliže této hodnotě se blíží obsah kyseliny octové ve vzorku Merlot rosé, ročník 2008, u něhož bylo stanoveno množství 1,15 g/l.

7.6 Návratnost a reprodukovatelnost stanovení organických kyselin

Bylo dosaženo návratnosti 94 – 104 % při destilaci vín pro různé koncentrace jednotlivých organických kyselin. Reprodukovatelnost metody byla zkoušena pomocí analýzy během 6 dnů.

ZÁVĚR

Organické kyseliny jsou jednou z nejvýznamnějších látek vyskytující se v hroznové šťávě a ve víně. Na konzumenta působí svými organoleptickými vlastnostmi (barva, aroma) a zároveň zlepšují stabilitu a mikrobiologickou kvalitu vína. I v malých koncentracích mají velký vliv na technologické vlastnosti výrobků, ovlivňují průběh chemických a enzymových reakcí, mikrobiologickou stabilitu potravin během skladování a zpracování a to tím, že určují hodnotu pH potraviny. Kyseliny ovlivňují sensorický projev vyrobeného vína a zároveň mohou sloužit jako konzervační činidlo. Z těchto důvodů je vhodné organické kyseliny stanovovat. Cílem práce bylo stanovit kyselinu vinnou, jablečnou, citronovou, mléčnou, octovou a jantarovou ve 22 vzorcích vín. Vína pocházela z vinařské soutěže Král vín České republiky 2009 a jednalo se o nejlépe hodnocené vzorky. Literatura [93] udává množství organických kyselin, hlavně kyseliny vinné, jablečné, mléčné ve víně v rozpětí 5 – 6 g/l. Žádný ze vzorků nám poskytnutých vín, této hranice nedosahuje. Dále se v literatuře uvádí množství kyseliny octové, která se může vyskytovat v rozmezí 0,2 – 0,6 g/l. Námi stanovené výsledky tuto hranici převyšují. Je-li obsah kyseliny octové vyšší než 1,4 g/l, tak se doporučuje víno co nejdříve zkonzumovat. Této mezní hodnotě se blíží vzorek vína Merlot rosé, ročník 2008, který obsahoval množství 1,15 g/l. Obsah organických kyselin byl stanoven pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickým detektorem. Metoda vysoce účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickým detektorem je moderní, sofistikovaný způsob separace organických sloučenin, který dokáže svými vlastnostmi konkurovat nebo převyšovat jiné podobné metody. Výhodou této metody je rychlost a relativní levnost použití a dále široká oblast použitelnosti. Můžeme jí analyzovat ionty, polární i nepolární látky, látky těkavé a tepelně nestabilní. Výhodou tohoto typu detektoru je, že účinnost elektrochemického děje se blíží jedné a z tohoto důvodu nemusíme detektor kalibrovat na kvantitativní měření. Jako další výhodu můžeme zmínit to, že změny teploty neovlivní výsledky analýzy.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Zákon 321/2004 Sb., ze dne 29. 4. 2004 o vinohradnictví a vinařství a o změně některých souvisejících zákonů (zákon O vinohradnictví a vinařství)
- [2] PAVLOUŠEK, Pavel. *Výroba vína u malovinařů*. Praha : Grada Publishing, a.s., 2006. 100 s. ISBN 80-247-1247-4
- [3] Víno [online]. [cit. 2010-08-19]. Dostupné z WWW : <http://www.wineofczechrepublic.cz/>
- [4] MALÍK, Fedor. *Ze života vína*. Pardubice : Filip Trend Publishing, 2003. 221 s. ISBN 80-86282-27-9
- [5] ROP, Otakar, HRABĚ, Jan. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*. Zlín : Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009. 129 s. ISBN 978-80-7318-748-4
- [6] KUTTELVAŠER, Zdeněk. *Abeceda vína*. Praha : Radix, spol. s r.o., 2003. 296 s. ISBN 80-86031-43-8
- [7] PÁTEK, Jaroslav. *Nová vinařská abeceda*. Brno : Blok, 1995. 183 s. ISBN 80-7029-095-1
- [8] KRAUS, Vilém, FOFFOVÁ, Zuzana, VURM, Bohumil. *Nová encyklopedie českého a moravského vína 2. díl*. Praha : Praga Mystica, 2008. 311 s. ISBN 978-80-86767-09-3
- [9] Vyhláška č. 323/2004 Sb., ze dne 28. 5. 2004, kterou se provádějí některé ustanovení zákona O vinařství a vinohradnictví
- [10] KRAUS, Vilém, HUBÁČEK, Vítězslav, ACKERMANN, Petr. *Rukověť vinaře*. Praha : KVĚT, BRÁZDA, 2000. 284 s. ISBN 80-85362-34-1, 80-209-0286-4
- [11] SKELTON, Stehen. *Viticulture – An introduction to commercial grape growing for wine production*. London : Lulu.com, 2007, 238 s. ISBN 0-9514-7031-0
- [12] HAFT, Jindřich. *Nový breviář o víně*. Praha : SVĚPOMOC, 1988. 336 s.
- [13] KERRIDGE, Georgie, ANTCLIFF, A.,J. *Wine grape varieties*. CSIRO Publishing, 1999. 205 s. ISBN 0-643-05982-2
- [14] Vinná réva – rostlina [online]. [cit. 2010-04-19]. Dostupné z WWW : <http://www.ovoce-zelenina.atlasrostlincz/>

- [145] ROP, Otakar, VALÁŠEK, Pavel, HOZA, Ignác. *Teoretické principy konzervace potravin I, Hlavní konzervářské suroviny*. Zlín : Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005. 130 s. ISBN 80-7318-339-0
- [16] DRDÁK, M., STUDNICKÝ, J., MÓROVÁ, E., KAROVIČOVÁ, J. *Základy potravinářských technologií*. Bratislava : MALÉ CENTRUM, 1996. 512 s. ISBN 80-967064-1-1
- [17] POSPÍŠILOVÁ, Dorota. *Ampelografia*. Bratislava : Příroda, 1981. 347 s
- [18] PRIEWE, Jens. *Víno-Malá škola*. Praha : Euromedia Group, 2002. 96 s. ISBN 80-242-0848-2
- [19] ČEPIČKA, Jaroslav a kol. *Obecná potravinářská technologie*. Praha : VŠCHT, 1995. 246 s. ISBN 80-7080-239-1
- [20] DUDÁŠ, František. *Skladování a zpracování rostlinných výrobků*. Praha : Státní zemědělské nakladatelství, 1981. 384 s.
- [21] SON, H.-S. et. al. Characterization of wines from grape varieties through multivariate statistical analysis of H NMR spectroscopic data. *Food Research International*, Vol. 42, 2009. p. 1483-1491
- [22] HRABĚ, Jan, ROP, Otakar, HOZA, Ignác. *Technologie výroby potravin rostlinného původu*. Zlín : Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005. 178 s. ISBN 80-7318-372-2
- [23] DAVÍDEK, Jiří, JANÍČEK, Gustav, POKORNÝ, Jan. *Chemie potravin*. Praha : SNTL, 1983. 632 s.
- [24] LIPSKI, Elizabeth. *Digestive wellness*. McGraw-Hill Professional, 2004. 440 s. ISBN 0-07-144196-4
- [25] MCMURRY, John. *Organic chemistry*. Books/cole cengage learning. 1224 s. ISBN-10:0-495-11837-0, ISBN-13:978-0495118374
- [26] ROMERO, E.G., MUNOZ, G.S. Determination of organic acids in grape musts, wines and vinegars by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, Vol. 655, 1993. p. 111-117
- [27] Organické kyseliny [online]. [cit. 2010-03-24] Dostupné z WWW: <http://www.dionex.com//>

- [28] MATO, Inés. et al. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food research international*, Vol 38, 2004. p. 1175-1188
- [29] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. Tábor : OSSIS, 1999. 328 s. ISBN 80-902391-4-5
- [30] CEREVITINOV, F.V. *Chemické složení a fyzikální vlastnosti ovoce a zeleniny*. Praha : Průmyslové nakladatelství, 1952. 322 s.
- [31] THONGES, Heinrich. *Ovocné šťávy, vína a likéry*. Bratislava : PRÍRODA, a.s., 1997. 128 s. ISBN 80-07-00941-8
- [32] SWEETMAN, Crystal. et al. Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry*, Vol. 70, 2009. p. 1329 – 1344
- [33] ZOECKLEIN, Bruce. W. *Wine analysis and production*. Springer Science & Business, 1995. 621 s. ISBN 0-412-98921-2
- [34] JACKSON, Ron. S. Chemical Constituents of Grapes and Wine. *Wine Science*, 2000. p. 232 – 280 ISBN 978-0-12-379062-0
- [35] BUCHAR, Eugen, DOUBRAVA, Jaroslav, LIPTHAY, Tibor. *Organická chemie pro pedagogické fakulty*. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, 1973. 372 s.
- [36] SHIMADA, Mikio. et al. A proposed role of ozalid acid in wood decay systems of wood-rotting basidiomycetes. *Mikrobiology Reviews*, Vol 13, 1994. p. 285-296
- [37] GÜRÜ, Metin. et al. Production of ozalid acid from beet molasses by formal nitrogen oxides. *Bioresource technology*, Vol 77, 1999. p. 81-86
- [38] FENGWU, Wu. et al. HPLC determination of ozalid acid using tris (1,10-phenanthroline) ruthenium (II) chemiluminescence- application to the analysis of spinach. *Food Chemistry*, Vol 65, 1998. p. 543-546
- [39] LEE, G. Eun. et al. Lactic acid recovery using two – stage electro dialysis and its modelling. *Journal of Membrane Science*, Vol 145, 1998. p. 53-66
- [40] ROJAN, P. John, et al. Direct lactic acid fermentation : Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production, *Biotechnology Advances*, Vol 27, 2009. p. 145-152
- [41] MIKOVÁ, Helena, ROSENBERG, Michal, KRIŠTOFÍKOVÁ, Ludmila. *Chemické listy-odborný časopis*. Praha, 2000. č.95. s. 28-33. ISSN 1213-7103

- [42] CHICHESTER, C. O. *Advances in Food Research*. New York : Academic Press, 1982. 409 s. ISBN 0-12-016428-0
- [43] HAJŠLOVÁ, Jana, VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Praha : VŠCHT, 1991. 142 s. ISBN 80-7080-097-6
- [44] FRESENIUS, Remigius C., JOHNSON, Samuel William. *Manual of qualitative chemical analysis*. New York : John Wiley, 434 s.
- [45] ALMELA, L., LÁZARO, I., LÓPEZ-ROCA, J. M., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A. Tartaric acid in frozen musts and wines. Optimalization of Rebelein's Metod and validation by HPLC. *Food Chemistry*, Vol 47, 1993. p. 357-361
- [46] OLIVEIRA, S.M., LOPES, T.I.M.S., TÓTH, I.V., RANGEL, A.O.S.S. Simultaneous determination of tartaric acid and potassium in wines usány a multicommuted flow systém with dialysis. *Talanta*, 2008. doi 10.1016/j.talanta.2010.03.032
- [47] GAO, C., FLEET, G.H. Degradation of malic and tartaric acids by high density cell suspensions of wine yeasts. *Food Mikrobiology*, Vol. 12, 1995. p. 65-71
- [48] MAZZEI, Franco, BOTRÉ, Francesco, FAVERO, Gabriele. Peroxidase based biosensors for the selective determination of D,L-lactic acid and L-malic acid in wine. *Microchemical Journal*, Vol 87, 2007. p. 81-86
- [49] MATAIX, E., LUQUE DE CASTRO, M. D. Determination of L (-)-malic acid and L (+)-lactic acid in wine by a flow injection-dialysis-enzymic derivatisation approach. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 428, 2001. p. 7-14
- [50] KOSSEVA, M., BESCHKOV, V., KENNEDY, J. F., LLOYD, L. L. Malolactic fermentation in Chardonnay wine by immobilised *Lactobacillus casei* cells. *Process Biochemistry*, Vol. 33, 1998. p. 793-797
- [51] HÁLKOVÁ, Jana, RUMÍŠKOVÁ, Marie, RIEGLOVÁ, Jana. *Analýza potravin - laboratorní cvičení*. Brno : Masarykova Univerzita v Brně, 2000. 164 s.
- [52] DAVÍDEK, Jiří a kol. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Praha : SNTL- Nakladatelství technické literatury, 1981. 720 s

- [53] PERES, R. G. et al. Rapid Method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Kontrol*, Vol 20, 2009. p. 548-552
- [54] ZEPPA, Guiseppo, CONTERNO, Lorenza, GERBI, Vincenzo. Determination of Organic Acids, Sugars, Diacetyl, and Acetoin in Cheese by High-Performance Liquid Chromatography. *Food Chemistry*, Vol. 49, 2001. p. 2722-2726
- [55] CSERHÁTI, Tibor, FORGÁCS, Esther. *Chromatography in food science and technology*. New York : CRC Press, 1999. 552 s. ISBN 1-56676-749-0
- [56] NOLET, Leo. M. L. *Handbook of Food Analysis: Physical characterization and nutrient analysis*. New York : CRC Press, 2004. 912 s. ISBN 0-8247-5036-5
- [57] MASÁR, Marián. et al. Determination of organic acids and inorganic anions in wine by isotachopheresis on a planar chip. *Journal of Chromatography A*, Vol 916, 2001. p. 167-174
- [58] ASHURST, Philips. R. *Production and Packaging of Non-Carbonated Fruit Juices and Fruit Beverages*. New York : Springer, 1994. 429 s. ISBN 0-8342-1289-7
- [59] BUBLÍKOVÁ, Lenka. *Situační a výhledová zpráva – réva vinná a víno*. Praha : Ministerstvo zemědělství České republiky, 2009. 88 s. ISBN 978-80-7084-793-0
- [60] KRAUS, Vilém, FOFFOVÁ, Zuzana, VURM, Bohumil, KRAUSOVÁ Dáša. *Nová encyklopedie českého a moravského vína 1. díl*. Praha : Praga Mystica, 2005. 306 s. ISBN 80-86767-00-0
- [61] CALLEC, Christian. *Encyklopedie vína*. Praha : REBO Productions, 2003. 320 s. ISBN 80-7234-223-1
- [62] STELLMAN, Jeane. Mager. *Encyclopaedia of Occupational Health and Safety : Chemical, industrie and occupations*. International Labour Organization, 1998. 1253 s. ISBN 92-2-109816-8
- [63] SELDON, Philips. *Vína*. Praha : PRAGMA, 1996. 364 s. ISBN 80-7205-815-0
- [64] WHEELIS, Mark. *Principles of Modern Mikrobiology*. Sudbury: Jones & Bartlett Publisher, 2007. 496 s. ISBN 978-443-5000

- [65] ODSTRČIL, Jaroslav, ODSTRČILOVÁ, Milada. *Chemie potravin*. Brno : Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2006. 164 s. 57-853-06
- [66] DRDÁK, Milan. *Technológia rostlinných nezdržných potravín*. Bratislava : Alfa, vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, 1989. 304 s. ISBN 80-05-00121-5
- [67] Nařízení Komise (ES) č. 606/2009, ze dne 10. července 2009, kterým se stanoví některé prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 479/2008 pokud jde o druhy výrobků z révy vinné, enologické postupy a omezení, které se na ně používají
- [68] COCOLIN, L., BISSON, L.F., MILLS, D.A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Mikrobiology Letters*, Vol. 189, 2000. p. 81-87
- [69] *Saccharomyces cerevisiae* [online]. [cit. 2010-11-21]. Dostupné z WWW : <http://images.google.cz/>
- [70] BOEKHOUT, T., ROBERT, Vincent. *Yeasts in food: benefica and deterimental aspects*. Hamburg : Behr's Verlag DE, 2003. 488 s. ISBN 3-86022-961-3
- [71] JANČÁŘOVÁ, Irena, JANČÁŘ, Luděk. *Analytická chemie*. Brno : Mendlova zemědělská a lesnická Univerzita v Brně, 2003. 195 s. ISBN 80-7157-647-6
- [72] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava : Nakladatelství Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2
- [73] KATZ, Elena et al. *Handbook of HPLC*. CRC Press, 2002. 1008 s. ISBN 0-8247-9444-3
- [74] MIKEŠ, Otakar. *Laboratorní chromatografické metody*. Praha : SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1980. 676 s.
- [75] LEDERER, E., LEDERER, M. *Chromatography a review of principles and applications*, Second edition. Elsevier publishing company, 1957. 711 s.
- [76] DONG, W. M. *Modern HPLC for practicing scientists*. John Wiley and Sons, 2006. 286 s. ISBN-13: 978-0-471-72789-7, ISBN-10: 0-471-72789-X
- [77] ŠTULÍK, Karel a kol. *Analytické separační metody*. Praha : Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství KAROLINUM, 2004. 264 s. ISBN 80-246-0852-9
- [78] GRATZFELD – HÜSGEN, Angelika, SCHUSTER, Rainer. *HPLC for Food Analysis*. Agilent Technologies, 2001. 134 s. 5988-3294EN

- [79] ZÝKA, Jaroslav. *Nové směry v analytické chemii*, Svazek II. Praha : SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1984. 217 s.
- [80] LINDSAY, Sandie. *Einführung in die HPLC*. Springer, 2000. 265 s. ISBN 3-528-06759-4
- [81] PUNGOR, E. *A practical Guide to Instrumental Analysis*. CRC Press, 1995- 384 s. ISBN 0-8493-8681-0
- [82] LINDSAY, Sandie, BARNES, John. *High Performance Liquid Chromatography*, Second Edition. John Wiley and Sons, 1992. 337 s. ISBN 0-471-93115-2
- [83] PAPADOYANNIS, I. N. *HPLC in clinical chemistry*. CRC Press, 1990. 488 s. ISBN 0-8247-8139-2
- [84] POMERANZ, Y., MELOAN, C.E. *Food analysis-theory and praktice*, Third Edition. New York: Chapman & Hall, 1994. 762 s. ISBN 0-8342-1826-7
- [85] KARDOŠ, Emil, BEREK, Dušan. *Základy kvapalinovej chromatografie*. Bratislava : ALFA – Vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, 1979. 283 s.
- [86] Dávkovací zařízení [online]. [cit. 2010-04-19]. Dostupné z WWW : <http://web.natur.cuni.cz//>
- [87] Kolona [online]. [cit. 2010-04-19]. Dostupné z WWW : <http://hplc.sweb.cz//>
- [88] ZÝKA, Jaroslav. *Nové směry v analytické chemii*, Svazek I. Praha : SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1983. 199 s.
- [89] WILSON, Keith, WALKER, John. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. Cambridge University Press, 2000. 784 s. ISBN 978-05-2165-873-7
- [90] MUJTABA, I. M. *Batch distillation: design and operation*. Imperial College Press, 2004. 396 s. ISBN 1-86094-437-X
- [91] Modifikovaná Hortvet – Sellier destilační aparatura [online]. [cit. 2010-04-19]. Dostupné z WWW : <http://images.google.cz//>
- [92] HONEYCHURCH, C., Kevin, GILBERT, Lucy, HART, P., John. Electrocatalytic behaviour of citric acid at a kobalt phthalocyanine – modified screen – printed karbon electrode and its application in pharmaceutical and food analysis. *Anal Bioanal Chem*, Vol. 396, 2010. p. 3103-3111

[93] Množství organických kyselin ve víně [online]. [cit. 2010-05-10]. Dostupné z WWW :
<http://projektysipvz.gytool.cz/>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

aj.	a jiné
cca.	Cirka
č.	číslo
°ČNM	Československý normalizovaný moštoměr
ECD	Elektrochemický detektor
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
j. š.	jižní šířky
°Kl	Klosterneuburský moštoměr
ks.	Kus
NADH	Nikotin amid adenin dinukleotid hydrogen
Př.n.	Před našim
Sb.	sbírka
s. š.	severní šířka
Ssp.	Subspecies
tzv.	takzvaný

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Rostlina révy vinné [14].....	16
Obrázek 2 – Tvar střípaců [17].....	18
Obrázek 3 – Typy květů [17]	19
Obrázek 4 – α -D-glukóza	22
Obrázek 5 – Strukturní vzorec kyseliny octové	26
Obrázek 6 - Strukturní vzorec kyseliny jantarové	27
Obrázek 7 - Strukturní vzorec kyseliny mléčné.....	28
Obrázek 8 - Strukturní vzorec kyseliny jablečné	29
Obrázek 9 - Strukturní vzorec kyseliny vinné	30
Obrázek 10 - Strukturní vzorec kyseliny citronové.....	31
Obrázek 11 – Vinařské oblasti a podoblasti České republiky podle vyhlášky č. 324/2004 Sb. [8].....	34
Obrázek 12 – Vinařská podoblast litoměřická [60].....	36
Obrázek 13 – Moravské vinařské oblasti [6].....	37
Obrázek 14 – Vinařská podoblast mikulovská [60].....	37
Obrázek 15 – Vinařská podoblast slovácká [60].....	38
Obrázek 16 – Schéma výroby vína [20]	40
Obrázek 17 – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> [69]	45
Obrázek 18 – Schéma kapalinového chromatografu [72].....	52
Obrázek 19 – Dávkovací zařízení [86]	53
Obrázek 20 – Chromatografická kolona [87].....	54
Obrázek 21 – Fotometrický detektor [88].....	55
Obrázek 22 – Refraktometrický detektor [88].....	55
Obrázek 23 – Fluorimetrické detektor [88].....	56
Obrázek 24 – Chromatograf HPLC, na kterém byla provedena analýza	63
Obrázek 25 – Stříkačka Hamilton.....	63
Obrázek 26 – Modifikovaná Hortvet - Sellier destilační aparatura [91].....	65
Obrázek 27 – Ryzlink rýnský [17].....	87
Obrázek 28 – Frankovka [17]	87
Obrázek 29 – Tvar bobulí [19].....	88
Obrázek 30 – Modifikovaná Hortvet-Sellier destilační aparatura [88].....	89

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Chemické složení jednotlivých částí hroznů (hm%) [4]	21
Tabulka 2 – Obsah jednotlivých látek v bobuli a v moštu (hm%) [2]	43
Tabulka 3 – Koncentrace kyselin ve vzorcích vín [g/l]	71

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 – Vliv napětí na odezvu detektoru kyseliny vinné, citronové, jantarové.....	67
Graf 2 – Vliv napětí na odezvu detektoru kyseliny jablečné, octové, mléčné.....	67
Graf 3 – Závislost plochy píku na koncentraci kyseliny jablečné, octové, mléčné v rozmezí 10 – 100 mg/l.....	69
Graf 4 - Závislost plochy píku na koncentraci kyseliny jablečné, octové, mléčné v rozmezí 100 – 1000 mg/l.....	69
Graf 5 – Závislost plochy píku na koncentraci kyseliny citronové, vinné, jantarové v rozmezí 10 – 100 mg/l.....	70
Graf 6 - Závislost plochy píku na koncentraci kyseliny citronové, vinné, jantarové v rozmezí 100 – 1000 mg/l.....	70

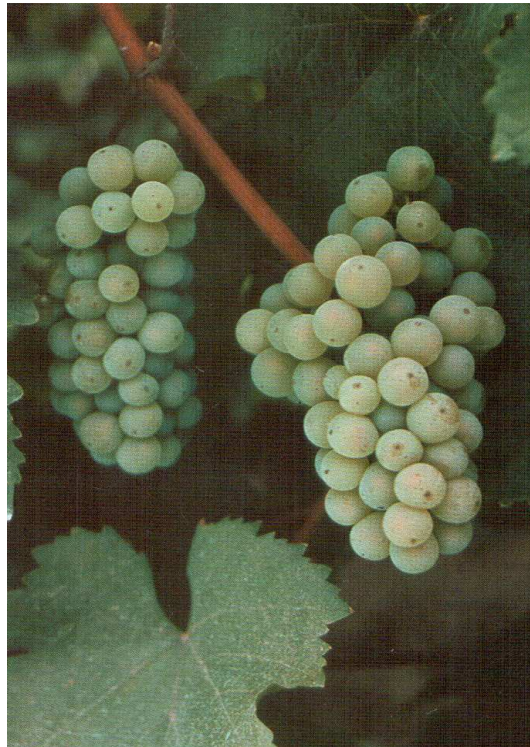
SEZNAM PŘÍLOH

I: RYZLINK RÝNSKÝ A FRANKOVKA

II: TVAR BOBULÍ

III: MODIFIKOVANÁ HORTVET – SELLIER DESTILAČNÍ APARATURA

PŘÍLOHA I: RYZLINK RÝNSKÝ A FRANKOVKA

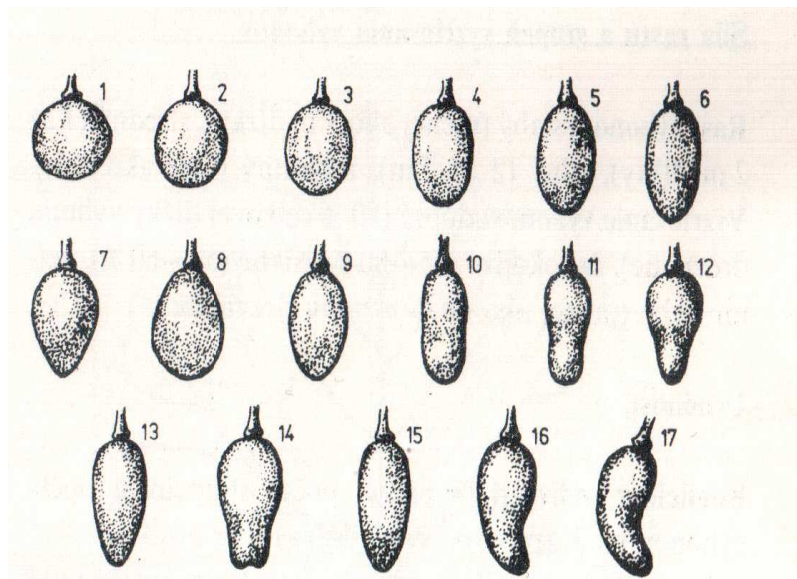


Obrázek 27 – Ryzlink rýnský [17]



Obrázek 28 – Frankovka [17]

PŘÍLOHA II: TVAR BOBULÍ



Obrázek 29 – Tvar bobulí [19]

1-stlačený, 2-kulatý, 3-kulovitý, 4-elipsoidní, 5-prodloužený, 6-dlouhý, 7-vejcovitý, 8-obráceně vejcovitý, 9-s vypouklými boky, 10-cylindrický, 11-poškótovitý, 12-kyjovitý, 13-s ostrým vrcholem, 14-s tupým vrcholem, 15-symetrický, 16-jednostranně otevřený, 17-kyjovitě zahnutý

PŘÍLOHA III: MODIFIKOVANÁ HORTVET-SELLIER DESTILAČNÍ APARATURA



Obrázek 30 – Modifikovaná Hortvet-Sellier destilační aparatura [88]