

Diacetyl jako parametr jakosti červeného vína, změny jeho obsahu při rozdílné technologii výroby vína

Bc. Tomáš Juřík

Diplomová práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tomáš JURÍK**
Osobní číslo: **T09542**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Diacetyl jako parametr jakosti červeného vína,
změny jeho obsahu při rozdílné technologii výroby
vína**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizujte diacetyl především ve vztahu k hroznovému vínu.
2. Vymenujte metody stanovení diacetylu.
3. Popište technologii výroby vína.

II. Praktická část

1. Analyzujte množství diacetylu ve vzorcích vína připravených různou technologií.
2. Naměřené výsledky diskutujte s dostupnou literaturou.



Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] ROP, O., HRABĚ, J. Nealkoholické a alkoholické nápoje, 1. vydání, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín 2009.
- [2] KLOUDA, P. Moderní analytické metody, 2. upravené a doplněné vydání, Pavel Klouda, Ostrava 2003.
- [3] JACKSON, Ron S. Wine science: principles, practice, perception, 2nd ed. Elsevier Acad. Press, Amsteram 2008.
- [4] LUES, R. F. J., BOTHA C. W., SMIT, J. E. Ion-exchange HPLC of Cheese-related Organic Acids in Comparison with Reverse-phase HPLC, Elsevier - International Dairy Journal, Vol. 8, Issue 12, 1998. p. 959-965.
- [5] Situační a výhledová zpráva réva vinná a víno - duben 2010, Ministerstvo zemědělství České republiky, Praha 2010.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Pavel Hanuštiak**
Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce: **25. února 2011**

Termín odevzdání diplomové práce: **20. května 2011**

Ve Zlíně dne 21. března 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Miroslav Fišera, 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 nevýdělečně 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 vzdělávacího 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 výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo popsat zpracování vinné révy a výrobu červeného vína, zaměřit se na fázi jablečno-mléčného kvašení a charakterizovat diacetyl, látku udávající máslové aroma a chuť vínu, a metody jeho stanovení. V experimentální části bylo metodou HPLC stanovena koncentrace diacetylu ve vzorcích vína dvou odrůd (Cabernet Moravia a Zweigeltrebe) a popsána závislost jeho množství na průběhu jablečno-mléčného kvašení.

Klíčová slova: výroba vína, jablečno-mléčné kvašení, diacetyl, HPLC

ABSTRACT

The aim of this thesis was to describe processing of grapes and red wine production, focus on malolactic fermentation and characterize diacetyl, a substance supplying buttery flavour, and methods of its determination. In the practical part diacetyl in wine samples of two varieties (Cabernet Moravia and Zweigeltrebe) was determined by HPLC, and there were described its dependence on malolactic fermentation.

Keywords: wine production, malolactic fermentation, diacetyl, HPLC

Děkuji panu Ing. Pavlu Hanuštiakovi za vedení diplomové práce a cenné rady při jejím zpracovávání. Rovněž děkuji paní Ing. Daniele Sumczynski, Ph.D. a paní laborantce Ing. Lence Fojtíkové za ochotu a pomoc při práci v laboratoři. Poděkování patří také mým blízkým, kteří mě během studia po všech stránkách podporovali.

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

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 TECHNOLOGIE VÝROBY ČERVENÉHO VÍNA	13
1.1 SKLIZEŇ HROZNŮ	13
1.2 DOPRAVA A PŘÍJEM HROZNŮ	13
1.3 VÝROBA RMUTU	14
1.4 MACERACE NAKVÁŠENÍM RMUTU	14
1.4.1 Úprava rmutu sířením a přidavkem pektolytických enzymů.....	15
1.4.1.1 Síření.....	15
1.4.1.2 Přídavek pektolytických enzymů	15
1.4.2 Způsoby nakvašování rmutu	16
1.5 LISOVÁNÍ RMUTU	18
1.5.1 Druhy lisů.....	18
1.6 ÚPRAVA MOŠTU	19
1.6.1 Pro vzdušnění moštu	19
1.6.2 Síření	20
1.6.3 Odkalení	20
1.6.4 Doslazení.....	21
1.6.5 Odkyselování.....	21
1.6.6 Přídavek aktivního uhlí	22
1.6.7 Ošetření enzymy a úprava tříslovin.....	22
1.7 KVAŠENÍ MOŠTU.....	22
1.8 BIOLOGICKÉ ODBOURÁVÁNÍ KYSELIN.....	24
1.9 OŠETŘOVÁNÍ A ZRÁNÍ VÍNA	24
1.9.1 Dolévání vína	25
1.9.2 Stáčení vína	25
1.9.3 Odkyselování vína.....	25
1.9.4 Síření vína	26
1.9.5 Číření vína.....	26
1.9.6 Scelování vína	27
1.10 FILTRACE A LAHVOVÁNÍ VÍNA	27
2 JABLEČNO-MLÉČNÉ KVAŠENÍ.....	29
2.1 BAKTERIÁLNÍ KULTURY JABLEČNO-MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	30
2.2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ JABLEČNO-MLÉČNÉ KVAŠENÍ	31
2.2.1 Hodnota pH	31
2.2.2 Teplota.....	31
2.2.3 Obsah oxidu siřičitého.....	31
2.3 VLIV JABLEČNO-MLÉČNÉHO KVAŠENÍ NA ORGANOLEPTICKÉ VLASTNOSTI VÍNA	32
2.3.1 Tvorba diacetylu a jeho smyslové vnímání ve víně	32

3	DIACETYL A JEHO CHARAKTERIZACE	33
3.1	CHEMICKÁ STRUKTURA DIACETYLU	33
3.2	VLASTNOSTI DIACETYLU	33
3.3	SMYSLOVÉ VNÍMÁNÍ DIACETYLU VE VÍNĚ.....	34
3.4	METABOLISMUS KYSELINY CITRONOVÉ	34
3.5	FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ MNOŽSTVÍ DIACETYLU VE VÍNĚ.....	35
3.5.1	Výběr bakteriální kultury a dávka inokula	36
3.5.2	Teplota a pH při jablečno-mléčném kvašení.....	36
3.5.3	Koncentrace kyseliny citronové a oxidu siřičitého	36
3.5.4	Kontakt moštu s kyslíkem a usazeninami kvasinek během jablečno-mléčného kvašení	37
3.6	„POPCORN LUNG DISEASE“	37
4	METODY STANOVENÍ DIACETYLU	38
4.1	KOLORIMETRIE.....	38
4.2	POLAROGRAFIE.....	38
4.3	VÁŽKOVÉ STANOVENÍ	38
4.4	SPEKTROFOTOMETRIE.....	38
4.5	FLUORIMETRIE	39
4.6	CHROMATOGRAFIE	39
4.6.1	Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	40
4.6.1.1	Schéma a popis kapalinové chromatografie.....	41
4.6.2	Plynová chromatografie	43
5	CÍLE PRÁCE	44
II	PRAKTICKÁ ČÁST.....	45
6	METODIKA PRÁCE.....	46
6.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	46
6.2	POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	46
6.3	METODA STANOVENÍ DIACETYLU VE VÍNĚ.....	46
6.4	ANALYZOVANÉ VZORKY VÍNA.....	47
6.4.1	Použitá kultura bakterií	47
6.4.2	Úprava vzorků před stanovením	48
6.5	OPTIMALIZACE METODY A PODMÍNKY MĚŘENÍ	48
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	49
7.1	VÝSLEDEK MĚŘENÍ KALIBRAČNÍ KŘÍVKY STANDARDU DIACETYLU.....	49
7.2	VÝSLEDKY MĚŘENÍ VZORKŮ VÍNA.....	49
7.2.1	Vzorky od vinaře č. 1	50
7.2.2	Vzorky od vinaře č. 2	51

7.3	VLASTNÍ KOMENTÁŘ VÝSLEDKŮ A POROVNÁNÍ S DOSTUPNOU LITERATUROU.....	52
ZÁVĚR		55
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		57
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		63
SEZNAM OBRÁZKŮ		64
SEZNAM TABULEK		65
SEZNAM PŘÍLOH		66

ÚVOD

Víno patří k nejoblíbenějším a nejrozšířenějším kvašeným nápojům na světě. Jak z křesťanského hlediska (přijímání chleba a vína), tak z pohledu těch, kteří si je oblíbili pro jeho chuťové vlastnosti, je zcela nenahraditelným nápojem.

Český název pochází z latinského *vinum* a rovněž počátky pěstování vinné révy u nás jsou pravděpodobně spjaty s dobou antickou, a sice s pobýváním římských vojsk na jižní Moravě ve 2. století n. l., i když vinařská tradice je často mylně spojována až s Karlem IV..

Zprvu planá, divoká vinná réva byla křížením odrůd postupně zušlechťována, byly tak získávány výnosnější, kvalitnější a odolnější plody, vhodné pro danou oblast i účel zpracování.

Obliba vína celosvětově roste, což dokládají vzestupné tendence jeho spotřeby. Konzumace vína roste i u nás, v roce 2009 byla jeho spotřeba cca 19,1 l na osobu.

Dnešní konzument vína většinou již nerozlišuje pouze „bílé“ a „červené“ (event. „růžové“), stále častěji pátrá po dalších attributech vína, např. kde, kdy a kým bylo vyrobeno, odkud pocházejí hroznové bobule – učí se rozeznávat příchutě, vůně a tóny barev. Rozmanitost toho všeho je zdá se nekonečná a jen opravdoví znalci vína, zkušené vinaři a degustátoři rozpoznají jemné nuance.

Ne všechny z celé řady látek obsažených ve víně byly dosud analyzovány. Vedle látek zdraví prospěšných (vitamíny, minerální látky, polyfenoly atd.) zkoumáme i takové, které významně ovlivňují jeho chuť a vůni. Příkladem takové látky je v práci popisovaný diacetyl.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 TECHNOLOGIE VÝROBY ČERVENÉHO VÍNA

1.1 Sklizeň hroznů

Výroba vína začíná sklizní hroznů. Hrozny révy vinné v našich klimatických podmínkách a zeměpisné poloze dozrávají koncem srpna, v září a začátkem října, kdy se sklízí, s výjimkou pozdních a ledových sběrů. [1] Rozhodnutí o termínu sklizně závisí na několika faktorech: vyzrálosti hroznů, zdravotním stavu hroznů a požadovaném typu vína. Vyzrálost hroznů určují jednotlivé kvalitativními parametry, mezi které patří cukernatost, obsah kyselin, barviv, tříslovin a aromatických látek. [2] Pro kvalitu červených vín je určujícím faktorem přítomnost, obsah a složení antokyanových barviv a tříslovin (taninů). U modrých odrůd představují bobule menší velikosti vždy vyšší kvalitu z pohledu obsahu barviv, jemnosti taninů v semenech a obsahu a složení aromatických látek. [3]

U červeného vína je velmi důležité rozhodnout, jaký typ vína by se měl získávat. Na tomto rozhodnutí závisí celé zpracování, které výsledný produkt ovlivňuje více než u bílého vína. Počínaje vinicí až ke způsobu a délce skladování vína zde musí být zohledněna řada faktorů. Z možných typů vína lze získávat:

- 1) mladé víno s ovocným aroma, odrůdově typické s nižším obsahem tříslovin a alkoholu,
- 2) víno vhodné ke konzumaci po středně dlouhé době zrání se znatelným odrůdovým buketem, plné, s dostatkem tříslovin,
- 3) víno vhodné ke konzumaci po delší době zrání s komplexním aroma, barrique, vyšší množství tříslovin, je možná i směs více odrůd (cuvée). [2]

1.2 Doprava a příjem hroznů

Sklizené hrozny se dopravují do zpracovatelských závodů v různých obalech [4] (bedny, kádě, kontejnery, přívěsy), nebo jsou pomocí mlýnkoodzrňovacího návěsu rozdrčeny a odstopkovány přímo na vinici. Poslední variantou je použití polního lisu, kdy po vylišování hroznů ve vinici přepravujeme pouze mošt. U dopravy i příjmu hroznů je důležitá maximální opatrnost z hlediska jejich mechanického poškození. Přijímají se tedy hrozny celé (bedny, kontejnery), drčené nebo rmut (mlýnkoodzrňovače) nebo mošt (polní lis). [2] Při skládce hroznů se zjišťuje jejich hmotnost, stanovuje se průměrná cukernatost a jakostní skupina podle třídy, odrůdy a obsahu cukru. [4] K měření cukernatosti hroznů se

používá refraktometr, u vylisovaného moštu moštoměr. [3] Obsah cukru se udává ve stupních normalizovaného moštoměru ($^{\circ}\text{NM}$) a odpovídá obsahu zkvasitelných cukrů ve vinných hroznech, vyjádřených v kilogramech na 1 hektolitr hroznového moštu. [5]

1.3 Výroba rmutu

Hrozny se co nejdříve po sklizni drtí, neboli rmutují. Drcením se usnadňuje lisování a zvyšuje se jejich výlisnost. [5] U modrých hroznů tomuto procesu ještě předchází odstopkování (odzrňování), kdy jsou oddělovány bobule od třepin. Odstopkování by mělo proběhnout v případě naležení rmutu, kvašení rmutu při přípravě červeného vína a u nedokonale vyzrálých hroznů. [2] Tímto krokem předcházíme vyluhování tříslovin a chlorofylu, jež by způsobily přílišnou trpkost hotového vína. [6] Pro současné odzrňování a mlýnkování (drcení bobulí) slouží stroje, které se nazývají mlýnkoodzrňovače, též agrapumpy nebo fulograpy. [1] Drcením se ze 100 kg hroznů získá přibližně 90 litrů rmutu. [5]

1.4 Macerace nakvácením rmutu

Při výrobě červených vín se rmut z modrých hroznů musí nechat nakvášet, aby se do něj vyluhovala antokyanová barviva a třísloviny. Antokyanová barviva obsažená ve slupkách se uvolňují prakticky okamžitě po rozrušení bobulí při mletí nebo drcení. Uvolňují se i v roztoku, který neobsahuje alkohol. [3] K jejich úplnému vyluhování dochází po 3 – 5 dnech. [2] Taniny ze slupek se uvolňují dříve než taniny obsažené v semenech a jsou chuťově jemnější. K uvolňování potřebují alkohol. K jejich extrakci dochází 2. – 3. den macerace, při obsahu alkoholu 3 – 6 objemových procent. Taniny ze semen potřebují vyšší obsah alkoholu. Uvolňují se obvykle kolem 5. dne macerace, při obsahu alkoholu 7 objemových procent a výše. [3] Rmut se nakváší různým způsobem v dřevěných kvasných nádobách, ve větších sudech, které mají vybedněné dno, v betonových jímkách, v nádobách z plastů a ve velkovýrobě v kvasných tancích. Délka nakvašování je závislá na množství rmutu, teplotě místnosti i průběhu kvašení. Obvykle trvá 5 – 10 dní. [6] Příliš dlouhým nakvácením víno získává nepříjemnou chuť, nepřírozně hnědou barvu a navíc dochází k nežádoucímu octovému kvašení. [5] Teploty udržované při maceraci by se měly pohybovat v rozsahu 28 – 30 $^{\circ}\text{C}$. Pro lepší extrakci taninů a barviv jsou vhodné teploty 30 – 35 $^{\circ}\text{C}$, avšak tyto teploty již nesou s sebou významné rizikové faktory – stresové teploty pro kvasinky, možnost zvýšené produkce těkavých kyselin. Naopak při teplotách pod 25 $^{\circ}\text{C}$ je ma-

cerace podstatně pomalejší. Macerací v chladném sklepě nezískávají vína svoji chuťovou plnost. V chuti se často objevuje zvýšený podíl hořkých a trpkých tónů, protože nedochází ke kvalitní polymerizaci antokyanových barviv s tříslovinami. Nízké teploty snižující extraktivnost barviv způsobují u takto vyrobených vín nižší barevnost. [3]

1.4.1 Úprava rmutu sířením a přidavkem pektolytických enzymů

1.4.1.1 Síření

Síření slouží k ochraně před bakteriální, plísňovou kontaminací a před oxidací vzduchem. [4] Rovněž zabraňuje hnědnutí a podporuje vývoj buketu a čistých tónů vína. [2] Síření také podporuje tvorbu glycerolu při kvašení. Glycerol zvyšuje obsah bezcukerného extraktu ve víně a uděluje takto vyrobeným vínům plnou chuť. Zasířením se antokyanová barviva mírně odbarví, ale zabrání pozdější oxidaci, tudíž mají vína intenzivnější červenou barvu. [5] Čím dříve se přidavek SO_2 učiní, tím lépe bude rmut ochráněn. Síření se nejčastěji provádí pomocí prášku – pyrosulfitu draselného (disiřičitan draselný - $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$), a to přímo na hrozny, aby během odstopkování a drcení došlo k jeho promísení, nebo do rmutu. Při aplikaci $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ se vychází ze zjištění, že 10 g této látky uvolní 5 g oxidu siřičitého. Lze použít i tekutý oxid siřičitý, který se přidává až do moštu. [2] V zásadě by měl být zdravý rmut sířen tak, aby v moštu byl obsah volného SO_2 25 – 50 mg/l. [4] U moštů z nahnělých hroznů je možno tuto koncentraci SO_2 zvýšit. [5] Sířicí dávky hroznů udává tabulka.

Tab. 1. Sířicí dávky [2]

	Dávka SO_2 [mg/l]	vodný roztok SO_2 [g/hl]	$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ [g/hl]
Zdravé hrozny	0 - 50	0 - 5	0 - 10
Nahnělé hrozny	50 - 75	5 - 7,5	10 - 15
Botrytické hrozny	75 - 100	7,5 - 10	15 - 20

1.4.1.2 Přídavek pektolytických enzymů

Účelným ošetřením rmutu je také přidání pektolytických enzymů. Zejména v suchých létech může být obsah pektinů v hroznech velmi vysoký, což způsobuje problematické lisování rmutu a odkalování moštu. Štěpení pektinu probíhá pomocí enzymů pektináz, které jsou obsaženy v bobulích. Přidáním pektolytických enzymů se zvyšuje rychlost štěpení

pektinů. Důležitým faktorem je teplota, která by měla být vyšší než 10 °C, jinak je aktivita těchto enzymů velmi nízká. Mezi přednosti pektolytických enzymů patří zejména zkrácení doby naležení rmutu, rychlejší a lepší průběh lisování, vyšší výlisnost, lepší odkalení, klidnější průběh kvašení a lepší filtrovatelnost. [2] Jejich aplikace na rmut před nakvášením a před lisováním také může zlepšovat extrakci barviv. Dalšími používanými enzymy jsou glykosidázy, které se podílí především na uvolňování aromatických látek (glykosidů) z pevných částí bobulí. Nejvíce se uplatňují enzymatické preparáty se zvýšenou aktivitou enzymu β -D-glukosidázy. A dále například glukonázy, používané u výroby vína z botrytických hroznů, nebo protézy, vhodné k odstraňování bílkovinných zákalů bílých vín. [3]

1.4.2 Způsoby nakvašování rmutu

Při kvašení uniká oxid uhličitý, který nadnáší pevné částice rmutu, z nichž se vytváří pevná vrstva převážně slupek, která se usazuje na povrchu moštu a nazývá se „matolinový klobouk“. Klobouk je pouze z poloviny ponořen v kvasícím rmutu a jeho druhá polovina vyčnívá nad jeho povrch. Stykem se vzduchem oxiduje a podléhá octovým bakteriím, [6] a navíc nedochází k vyluhování barviv. Proto je nutné klobouk v pravidelných intervalech do kvasícího rmutu nořit. Dle způsobu ponořování klobouku do rmutu se používají následující způsoby nakvašování. [5]

Nejjednodušším a u nás nejpoužívanějším způsobem je nakvašování v otevřené nádobě s volně plujícím kloboukem. [5] Provádí se v dřevěných otevřených nádobách, v plastových kádích nebo nerezových nádobách. [3] Nádoba se plní jen do $\frac{3}{4}$ obsahu, protože se musí brát v úvahu zvětšení objemu při kvašení, dále vytvoření matolinového klobouku a přídavek cukru. Klobouk se následně v pravidelných časových intervalech noří tzv. hřeblem, či jinými ručními nebo elektrickými míchadly zpět do rmutu. [6] Extrakce barviv a taninů probíhá na základě pravidelného míchání rmutu, kdy dochází k neustálému kontaktu slupek a semen. Při míchání by měla být nádoba otevřená a mělo by docházet k makrooxidaci. Makrooxidace pozitivně působí na stabilizaci barviv a zjemnění taninů díky spojování barviv a taninů a jejich polymerizaci. Macerace se ukončuje podle požadovaného typu vína sensorickým hodnocením mladého vína. [3] Nevýhodou této metody nakvašování je nutnost ruční práce. [5]

Pro usnadnění ruční práce spojené s mícháním rmutu se používá metoda nakvácení v otevřených nádobách s ponořeným matolinovým kloboukem. [6] Klobouk je ponořen pod hladinou kvasícího moštu pomocí drátěného dna. [5] Tento způsob brání okysličování a naoctění matolinového klobouku, avšak absencí míchání nedochází k dostatečnému vyluhování barviv a tříslovin. Proto se osvědčilo odpouštění kádě a prolévání jejího obsahu rozkvašeným moštem, aby se alespoň částečně dosáhlo pohybu rmutu. [6]

Dalším způsobem je nakvácení v uzavřených kádích s ponořeným matolinovým kloboukem. Kontakt klobouku s moštem lze dosáhnout mechanickým pohybem rmutu, a to pomocí pneumatického zařízení na ponořování, míchacím tankem nebo rototankem. [2] Další možností je míchání plynem (CO₂). [5]

Nakvácení a vyluhování červeného barviva lze také podpořit spařením rmutu horkým moštem. Poltím bobulí horkým moštem slupky popraskají, jejich buňky se naruší a působením tepla a kyselin dojde k rychlému vyluhování barviva. [6] Další variantou urychlení extrakce barviv je ohřev rmutu. [5] Ten je vhodný především v případě nahnilých hroznů, kdy je cílem omezit dobu kontaktu moštu s nimi, anebo také ve velkých podnicích, které nemohou z kapacitních důvodů ponechat veškerý rmut prokvasit. Používají se dvě metody: dlouhodobý a krátkodobý ohřev. U dlouhodobého ohřevu se rmut ohřeje na 50 – 55 °C a ponechá se v klidu asi 2 hodiny. Pokud teplota nepřevyší hranici 65 °C, nehrozí nebezpečí vzniku varné příchuti vína. Poté se rmut vylisuje, zchladí a mošt se prokvasí. Při krátkodobém ohřevu se rmut zahřeje na pár minut na 70 °C a následně ochladí na teplotu kvašení. Tato teplota inaktivuje kvasinky a enzymy, proto je potřebné je dodat. [2]

Především v jižních vinařských státech se používá způsob „kvašení přes čtyři“. [5] Je založen na faktu, že přítomnost alkoholu podporuje vyluhování barviva ze slupek modrých hroznů. [6] Na rozkvašený rmut se proto nalije hotové zdravé červené víno v takovém množství, aby koncentrace etanolu činila 4 objemová procenta. [5]

Ve velkovýrobě se používá mnoho typů nakvašovacích nádob a zařízení. Rmut se nakvašuje v betonových jímkách, ocelových nádržích s mechanickými míchadly, ve speciálních kvasných nádržích či tancích s automatickým kvasným procesem. Jsou to různé rotonádrže, vinifikátory a kvasné nádrže různých systémů. Tato zařízení odstraňují namáhavou ruční práci a zkracují dobu nakvácení. Dalším zařízením jsou kvasné tanky MWB.

Tyto rychlonakvášecí tanky využívají k cirkulaci rmutu a moštu přetlaku CO_2 . Zařízení umožňuje i ohřev a chlazení rmutu. Celý proces trvá 48 – 56 hodin. Během kvašení nedochází k rozmělnování slupek míchadly, proto se matoliny lépe lisují. Vrstva CO_2 v přetlakové komoře znemožňuje oxidaci a nedochází ke ztrátám alkoholu odpařováním, protože nakvášení probíhá v uzavřeném prostoru. [6]

U všech těchto způsobů nakvášení je důležité jeho průběh pravidelně kontrolovat. Sleduje se především stupeň prokvašení, barevnost, obsah tříslovin a hlavně zdravotní stav rmutu. Vykvašení se pozná chutí a také tím, že matolinový klobouk klesne ke dnu kvasné nádoby. Po skončení nakvášení se rmut lisuje. [6]

1.5 Lisování rmutu

Lisováním oddělujeme mošt od tuhých částí rmutu. Intenzita lisování je ovlivňována konstrukcí lisu, použitým tlakem, mechanickými vlastnostmi rmutu, odrůdou a stupněm zralosti hroznů aj. Dále také tím, zda je rmut odzrněn či nikoliv. [6]

Při běžném lisování rmutu vznikají tři frakce. Scezený mošt neboli samotok odtéká z lisu samovolně. Obsahuje vyšší množství kyselin a cukrů, je světlejší a oproti ostatním frakcím má nižší extrakt. Druhou frakcí je lisovaný mošt, který vzniká použitím tlaku. Mísí se se scezeným moštem. Poslední frakcí je dolisek. Vyšším tlakem je porušována slupka bobulí, popřípadě i pecičky, takže mošt obsahuje vyšší množství barviv, tříslovin a minerálních látek. Naopak obsah kyselin a cukru je nižší. Při získávání kvalitních druhů vína by měl být dolisek zpracován samostatně. [2] Výlisnost hroznů se pohybuje okolo 70 – 75 %. [5]

1.5.1 Druhy lisů

Dle způsobu vytváření tlaku můžeme lisy rozdělit na mechanické, hydraulické a pneumatické. Dle polohy koše lisu rozlišujeme dále horizontální a vertikální lisy. Horizontální lisy jsou dnes běžným standardem. Otáčecí koš je zhotoven z plastu, pokovované oceli nebo nerezů a obsahuje zařízení k automatickému rozdrobení koláče. Pomocí zautomatizovaného řízení celého procesu může lisování probíhat bez zásahu člověka. S vertikálními lisy, mechanickými či hydraulickými se můžeme setkat i u menších producentů vína. [2]

Mechanické horizontální lisy neboli vřetenové lisy jsou relativně levné, a proto dosti rozšířené. [2] Šťáva z hroznů se uvolňuje prostým utahováním lisu. [3] Jejich nevýhodou je vysoké mechanické zatížení rmutu, takže mošt obsahuje větší podíl tříslovin a kalů.

Hydraulické horizontální lisy jsou výkonnější než vřetenové lisy. Je třeba u nich lisování regulovat, aby nedocházelo k překračování norem výlisnosti na úkor kvality moštu.

Nejmodernější jsou pneumatické lisy. V porovnání s hydraulickými lisy je jejich hlavní výhodou „měkké“ lisování rmutu, kdy nedochází k mechanickému poškození slupek, popřípadě i semen. [6] Používá se totiž nízký lisovací tlak do 1,9 atm. [2] Pracují na základě roztahování gumového vaku naplněného vodou nebo vzduchem, který svým tlakem lisuje hrozny umístěné v nerezovém koši. [3] Tyto lisy se od sebe liší lisovacím košem, který je buď z poloviny otevřený a mošt odtéká po vnější straně koše, nebo uzavřený, kdy je mošt veden kanálky na vnitřní stěně, popřípadě kanálky ve středu koše (lisy Willmes). Větší lisy jsou většinou vyrobeny s uzavřeným lisovacím košem, což omezuje oxidaci moštu. Jejich výhodou je navíc možnost naležení rmutu přímo v lisu. [2] Používání těchto lisů zaručuje získání kvalitního moštu pro výrobu špičkových vín. [6] V důsledku složitější konstrukce je však cena vyšší než u vřetenových lisů. [2]

1.6 Úprava moštu

Aby bylo dosaženo optimální kvality moštu, zaručující dobrý průběh kvašení a vysokou jakost vína, je třeba vylisovaný mošt dodatečně upravovat. Úpravou moštu je rozuměno jeho provzdušnění, síření, odkalení, doslazení, odkyselování, přidavek aktivního uhlí, ošetření enzymy a úprava tříslovin. [2]

1.6.1 Provzdušnění moštu

Provzdušnění moštu podporuje množení kvasinek, a tím i kvašení. Zvyšuje však vliv nežádoucích mikroorganismů, např. octových bakterií. Zdravý mošt se neprovzdušňuje. Tato úprava se používá u přesířeného moštu, u značně nahnílých hroznů a u lisování modrých hroznů za účelem výroby bílého vína. U posledních dvou případů je účelem provzdušnění snížení obsahu fenolických látek. Aktivita oxidačních enzymů způsobí nerozpustnost a vysrážení fenolických látek. [2]

1.6.2 Síření

Jelikož již byl pomocí SO₂ sířen rmut, popřípadě hrozny, není další zasíření nutné. Pouze v případě delšího stání moštu, velmi vysokých teplot při sklizni, či značně nahnilých hroznů je další síření nutné. Provádí se pomocí pyrosulfitu draselného dávkou 10 – 20 g/hl. [2]

1.6.3 Odkalení

K ochraně vinné révy proti chorobám se používají různé chemické přípravky, zejména fungicidy a pesticidy, které zanechávají na hroznech i v moštu nežádoucí látky, které mohou mít nepříznivý vliv na kvašení moštu. Mošt obsahuje také řadu mechanických nečistot, jako jsou zbytky slupek, třapin, pecičky a půdní částice. [6] Odkalení je jedním z nejdůležitějších postupů, který tyto nechtěné příměsi odstraňuje. [2] Nezbytné je také co nejrychlejší odkalení nahnilých hroznů. [6]

V případě zanedbání odkalení hrozí rychlé prokvašení moštu a ztráta jeho aroma. Ve víně se to projeví nečistou chutí, vyšším obsahem tříslovin, vyšší barvou, horší filtrovatelností, rychlým stárnutím a přítomností reziduí pesticidů. [2]

Obsah kalů by měl být snížen na maximálně 0,6 % objemu. Nad 1 % objemu již jsou patrné nečisté tóny vína. [2]

Odkalení lze provést kontinuálně nebo diskontinuálně. Diskontinuálním odkalením je myšlena sedimentace kalů v nádobě (sud, kád', tank) a následné stočení moštu. Účinnost sedimentace je závislá na čase.

Tab. 2. Závislost kvality odkalování na čase při diskontinuálním způsobu [2]

Čas [h]	Účinek
3 – 4	pouze hrubé odkalení, neovlivňuje kvašení vín
8 – 10	dobré odkalení, pomalé kvašení, vína bez postranních tónů
12 – 24	velmi čisté mošty, velmi pomalé kvašení

Ve velkých podnicích se z kapacitních i časových důvodů provádí kontinuální odkalení odstředivkami. [2] Je to rychlá a poměrně účinná metoda. [6] K velmi účinným a šetr-

ným metodám patří odkalování pomocí filtrace na vakuových rotačních filtrech nebo křemelinových naplavovacích filtrech a kalolisech.

Proces odkalení je velmi výhodné spojit s ošetřením bentonitem, [6] který slouží k odstranění termolabilní bílkoviny moštu. Jeho dávkování se pohybuje mezi 150 – 200 g/hl. Pokud je mošt ošetřován enzymy, je důležité jeho přidání až po jejich účinné době, to znamená 2 – 4 hodinách, jinak by byla jejich činnost ukončena. [2]

1.6.4 Doslazení

V nepříznivých letech hrozny některých odrůd nedozrají, a tak obsahují málo cukru. [6] Úprava cukernatosti se provádí přidavkem cukru, zahuštěným moštem. [4] Cukr se rozpustí v malém množství moštu, vlije do sudu či jiné nádoby a celý obsah se řádně zamíchá. Cukr se nikdy nepřidává rovnou z důvodu nedokonalého rozpuštění. [6] Docukření by se mělo provést do 72 hodin po lisování. [5] Červené rmuty se mohou doslazovat ještě před nakvácením, protože na obsahu etanolu do jisté míry závisí vyloužení červeného barviva [6] (docukřením se v konečné fázi zvyšuje obsah etanolu). [5]

Přidáním 1,053 kg cukru na 1 hl moštu se zvýší obsah cukru v moštu o 1 °NM. Hodnota 1,053 kg je z praktických důvodů zaokrouhlována na 1,1 kg. Při doslazování červených rmutů je nutné zohlednit podíl moštu ve rmutu. [3] Odrůdy s velkými bobulemi vykazují 85 – 90% podíl moštu (proto se používá přepočítávací koeficient 0,85 popř. 0,9), odrůdy s malými bobulemi 80% podíl moštu (koeficient 0,8). [2]

$$\text{potřeba cukru [kg]} = \text{počet } ^\circ\text{NM, o který je třeba cukernatost zvýšit} * \text{objem moštu [hl]} * 1,1 \text{ kg cukru} * \text{koeficient} \quad [3]$$

Každým doslazením nebo přidavkem doslazeného moštu zaniká právo na označení vína jako kabinet nebo víno s přívlastkem.

1.6.5 Odkyselování

Účelem odkyselování je snížení obsahu kyselin v moštu. [1] Odkyselují se mošty s obsahem kyselin vyšším než cca 12 g/l. [6] Důležitým faktem je rozklad částečného množství kyselin při kvašení moštu a ležení mladého vína na kvasnicích. Vysrážením kyseliny jablečné a biologickým odbouráním kyseliny mléčné se tak může obsah kyselin snížit o 2 – 3 g/l. [7]

Odkyselování se nejčastěji provádí uhličitanem vápenatým. Další možností je použití hydrogenuhličitanu draselného nebo uhličitanu vápenatého s malým množstvím podvojně vápenaté soli kyseliny vinné a jablečné (tzv. podvojně odkyselování). [2] Pomocí uhličitanu vápenatého se snižuje pouze obsah kyseliny vinné. [6] Kyselina vinná reaguje s uhličitanem vápenatým za vzniku nerozpustného vinanu vápenatého, který se z moštu vyloučí. [7] Hotová červená vína po vykvašení by měla obsahovat 4,5 – 6 g kyseliny vinné na 1 l vína. [6]

1.6.6 Přídavek aktivního uhlí

Použití aktivního uhlí má význam v případě nahnilých hroznů, kdy odstraňuje chuť po hnilobě. Uhlí na sebe váže látky zodpovědné za vůni, chuť a barvu. Pozitivem je, že kvasné aroma zůstává zachováno. Přesto se používá až v případech, kdy jiné prostředky nezabírají. Maximální povolená dávka je 100 g/hl.

1.6.7 Ošetření enzymy a úprava tříslovin

Pokud nejsou enzymy dodány ihned do rmutu, je třeba je třeba je přidat ještě do moštu.

Při velmi dlouhém naležení rmutu se do moštu dostává přílišné množství tříslovin. To způsobuje drsnou chuť vína a jeho rychlé stárnutí. Tento problém lze řešit přídavkem adsorpčních látek a prostředků snižujících obsah tříslovin, jako je želatina, kasein a polyvinylpolypyrrolidon (PVPP). [2]

1.7 Kvašení moštu

Alkoholové kvašení je základním a nejdůležitějším procesem podílejícím se na tvorbě vína. [3] Jeho podstatou je přeměna cukru obsaženého v moštu na etanol a oxid uhličitý pomocí kvasinek. [5]

Rovnice alkoholového kvašení:



Při tomto ději dochází rovněž k uvolnění aroma a tvorbě vedlejších sloučenin - vzniká kvasný buket. [2] Mezi tyto nové, vedlejší produkty kvašení patří glycerol, kyselina mléčná, octová, jantarová, citrónová, dále aceton, diacetyl, vyšší alkoholy, aldehydy, ketony, estery, aromatické látky aj. [3]

Kvašení je způsobeno činností kvasinek mnoha druhů. Základními jsou vinařské kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae*. [3]

Kvasinky se přirozeně vyskytují na bobulích, a to v místech, kde mají přístup ke šťávě (tam, kde je slupka narušená, v přechodu mezi slupkou a bobulí). Jsou zde přítomny ušlechtilé vinné kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae*, avšak jsou zastoupeny ve velmi malém množství. Naopak mnohonásobně více je tzv. divokých kvasinek, které zahajují kvašení. Mezi hlavní zástupce patří *Kloeckera apiculata*, rody *Candida* nebo *Metschnikowia*. Za přístupu vzduchu se tyto kvasinky namnoží na potřebný počet buněk (asi 10 milionů buněk/1 ml moštu). Při tomto počtu buněk může být zahájeno kvašení. U spontánního kvašení se nepoužívá přídavek žádných kulturních kvasinek. Divoké kvasinky často rychle zakvášejí, vytváří hodně glycerolu a na druhou stranu hůře snášejí alkohol (odumírají při 4 obj. %). Často také vzniká více těkavých kyselin a zůstává více zbytkového cukru, protože kvašení se samovolně zastaví. [2] Tato metoda se již dnes moc nepoužívá, [4] jelikož výsledek hodně závisí na okolních podmínkách, a může se tak prosadit jiný druh kvasinek. [2] Dnes se používá kvašení pomocí čistých kultur kvasinek, neboli řízené kvašení. [4] Přídavkem selektovaných čistých kultur kvasinek je zabráněno kvašení nežádoucím směrem. [2] Tyto kultury se přidávají buďto v kapalné formě, nebo častěji jako sušené preparáty – „aktivní suché vinné kvasinky“. Přídavek těchto preparátů je nutný především u moštu o vysoké cukernatosti (vína s přívlastkem), moštu z nahnilých hroznů a u opětovného překvácení a druhotného kvašení. [2]

Kvašení moštu probíhá v několika fázích. V první fázi se kvasinky přizpůsobují nepříznivým podmínkám moštu. Ve druhé rozmnožovací fázi, která nastává v průběhu několika hodin, nastává pučení kvasinek. Ve fázi hlavního kvašení kvasinky aktivně přeměňují cukry na etanol a v poslední fázi kvasinky začínají odumírat, případný obsah cukru ve víně je již stálý. [3]

Mezi faktory ovlivňující alkoholové kvašení patří teplota, cukernatost moštu, obsah etanolu, stupeň odkalení, obsah SO₂, obsah těkavých kyselin a dalších nežádoucích látek.

[3] Nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím kvašení je teplota. Optimální teplota, při které se kvasinky množí je kolem 25 °C. Při teplotách pod 23 °C obsahuje víno vyšší množství alkoholu, veškerých kyselin včetně kyseliny jablečné, acetaldehydu, polyfenolů a všech esterů. Naopak při teplotách nad 23 °C více glycerolu, zkvasitelných cukrů, kyseliny mléčné, těkavých kyselin, kyseliny pyrohroznové, isobutanolu, isoamylalkoholu, etylacetátu aj. [2]

U modrých odrůd je v hlavní fázi kvašení vhodné použít vyšších teplot (25 – 30 °C). [3]

Tab. 3. Vliv teploty na délku kvašení [3]

Teplota kvašení	Fáze nástupu kvašení	Fáze hlavního kvašení	Fáze dokvašení	Celková doba kvašení
15 °C	1 - 2 dny	7 dní	8 - 9 dní	18 dní
20 °C	méně než 1 den	4 dny	3 dny	9 dní
25 °C	méně než 1 den	2 - 3 dny	1 - 2 dny	6 dní

Po dokončení kvašení získáváme takzvané mladé víno. [4]

1.8 Biologické odbourávání kyselin

Další operací výroby vína může být biologické odbourávání kyselin, nazývané rovněž jako jablečno-mléčné kvašení. [2] Tato problematika je popsána dále v kapitole 2 Jablečno-mléčné kvašení.

1.9 Ošetřování a zrání vína

Ošetřování a školení (zrání) vína utváří komplexní senzoričké vlastnosti a celkový charakter vína. [4]

1.9.1 Dolévání vína

Důležitým opatřením ihned po dokvašení vína je jeho ochrana proti oxidaci vzdušným kyslíkem, [2] ztrátou jakosti a nemocí vína. [6] V průběhu školení se proto víno pravidelně dolévá, jelikož dochází neustále k odpařování vína a tím k nežádoucímu mikrobiologickému kažení. K dolévání se používá víno školené, [5] nejlépe stejné odrůdy a ročníku. [6] Velikost výparu závisí na teplotě a vlhkosti sklepa. Červená vína by měla zrát při 10 – 12 °C a relativní vlhkosti 60 – 80 %. [5]

1.9.2 Stáčení vína

Stáčením vína se rozumí vyprázdnění původní nádoby s vínem a naplnění jiné nádoby za účelem oddělení kalů. [2] Víno by se mělo stáčet tehdy, kdy má správný poměr kyselin k ostatním složkám vína. Kyselější vína se stáčí později. [6] Ležením na kvasnicích se snižuje jeho kyselost díky biologickému odbourávání kyselin. [5] To je podporováno rozmícháním kvasnic ve víně. [7] Termín prvního stočení vína nelze jednoznačně určit. V zásadě se dodržuje pravidlo, že brzy se stáčí vína lehčí s menším obsahem kyselin a méně alkoholická, dále vína z nahnilých hroznů, neodkalená vína a vína se žádoucím výrazným odrudovým aroma (odrudový buket by mohl převzít kvasničnou příchuť a druhotné vůně ležením na kvasnicích). [6] Přetáčení vína z nádoby do nádoby se provádí pomocí čerpadla, u malovinařů případně pomocí hadičky. [7] Při stáčení dochází více či méně ke kontaktu vína se vzduchem. U výroby červených vín toto provzdušnění není škodlivé, naopak přispívá ke zrání vína a stabilitě jeho barvy. [2]

1.9.3 Odkyselování vína

Biologickým odbouráváním se snižuje obsah kyselin, avšak pokud toto snížení není dostatečné, musí se přistoupit k dalšímu odkyselování vína. [7] Částečné odkyselování v moštu a mladém víně je povoleno v jakémkoliv rozsahu, v hotovém víně pouze „jemné“ odkyselování maximálně o 1 g/l. Obsah kyseliny vinné však musí činit alespoň 0,4 g/l. Běžně se odkyselování vína provádí uhličitánem vápenatým. K odkyselování o 1 g/l je třeba 67 g CaCO₃ na 100 litrů vína. Při extrémní kyselosti je vhodné použít podvojně odkyselování. Při tomto se za určitých předpokladů odstraňuje stejné množství kyseliny vinné a kyseliny jablečné. Přesné množství speciálního vápna se vsype do kádi a k němu se za stá-

lého míchání přečerpává přesné množství vína. Vznikají přitom krystaly podvojných soli, které se odstraňují. [2]

1.9.4 Síření vína

Síření je operace, kterou můžeme ošetřovat hrozny, rmut, mošt a také víno. Mezi přípravky síření patří sirné knoty, pyrosulfit draselný a zkapalněný SO_2 . [2] Spalováním sirných knotů (sirných plátků, sirných řezů) se zasířují prázdné sudy, či sklepy. Víno poté vzniklý SO_2 pohltní. [7] Sirné knoty obsahují elementární síru, probíhá tak rovnice:



U pyrosulfitu draselného je reakce:



Tato reakce probíhá pouze v kyselém prostředí, proto pyrosulfit nemůže být využíván k síření nádob.

Pod tlakem zkapalněný SO_2 se dávkuje ve formě kyseliny siřičité. Při uvolnění se však stává plynem a rozpouští se ve víně. [2]

1.9.5 Čiření vína

Čiřost je základním požadavkem spotřebitele na kvalitu vína. Čiření zajišťuje čistotu vína a urychlení usazování pevných částic v něm rozptýlených. Čiřosti se dosahuje kromě stáčení a spontánní sedimentace také použitím čířících prostředků. [3] Těch existuje celá řada, např. kasein, želatina, tanin, vaječný bílek, mléko, bentonit, vizina aj. [6] Pro čiření červených vín se asi nejvíce používá želatina a vaječný bílek. [3]

Želatina je látka živočišného původu, vyráběná z kostí a chrupavek. [2] U červených vín se jejím přidáním snižuje množství hořkých a trpkých tónů, a zlepšují se tak chuťové a aromatické vlastnosti těchto vín. [3] Želatina se totiž sráží s taninem a vytváří nerozpustný komplex bílkovina-tříslovina, který se pak usazuje na dně. Při použití želatiny se víno slabě odbarvuje. [6]

Vaječný bílek u červených vín snižuje obsah taninů. [3] Účinnou látkou je protein albumin. Bílek se rozšlehá na pěnu, smísí s malým množstvím vína a vlije do čiřené vína. Vznikající koaguláty se usadí na dně, nebo se vznášejí na hladině. [6] Za 3 – 4 dny je víno

vyčiřeno a stáčí se. [2] Bílek se používá čerstvý, sušený nebo ve formě obchodního přípravku k čiření. [3] Dávka je 1 – 3 vejce / 100 litrů vína. [2]

Čiřost vína se měří pomocí turbidimetru. [3]

1.9.6 Scelování vína

Víno z hroznů stejné odrůdy může mít v jednotlivých nádobách různou jakost i odlišný charakter. K odstranění těchto nechtěných rozdílů vína na základě sensorického hodnocení scelujeme, abychom dosáhli standardnosti. Obvykle se scelují málo alkoholická vína se silně alkoholickými, fádni s kyselejšími, atd. Při sestavách známkových vín se sceluje záměrně. Důvodem je totiž dosažení harmoničnosti jednotlivých složek vína, hlavně kyselin, cukru a alkoholu. [6]

1.10 Filtrace a lahvování vína

Po vyčiření vína následuje filtrace. Jejím cílem je zachycení zbývajících nečistot a zajištění stabilizace a čistoty vína v lahvích. [7] Filtrování je umělé čištění vína přes porézní materiál, který odděluje tyto pevné částice z vína: vysrážené bílkoviny, kalové částice čířících prostředků, polysacharidy, kvasinky, barviva aj. [6] Jako filtrační materiály se používají celulóza, křemelina a perlit. [2] Velikost pórů, propustnost a pórovitost jsou základní parametry pro výběr správného filtračního materiálu. [3]

Jednou z možností filtrace je křemelinová filtrace. [4] U tohoto způsobu se nejprve víno smísí s křemelinou a následně je na vhodném síti oddělen filtrační koláč tvořený křemelinou a zachycenými kaly. Dle provedení se rozlišují filtry s horizontálními nebo vertikálními síti. [2] Tento filtrační způsob je vhodný pro filtraci mladých vín. [3]

Nejrozšířenější metodou je desková filtrace. [6] Pro požadovanou filtraci (předfiltrace, hrubá filtrace, jemná filtrace,...) existují filtrační desky různých velikostí a typů. [3] Používají se celulózo-křemelinové desky. [6] Takto je filtrováno víno před lahvováním. [3]

Jednou z nejúčinnějších metod je membránová filtrace, která na rozdíl od předešlých metod může zamezit propustnost kvasinek a bakterií [2], a tudíž zajistit mikrobiální stabilitu. [3] Nezbytné je u membránového filtru předřazení hrubšího filtru, jinak dojde k zanesení. [2]

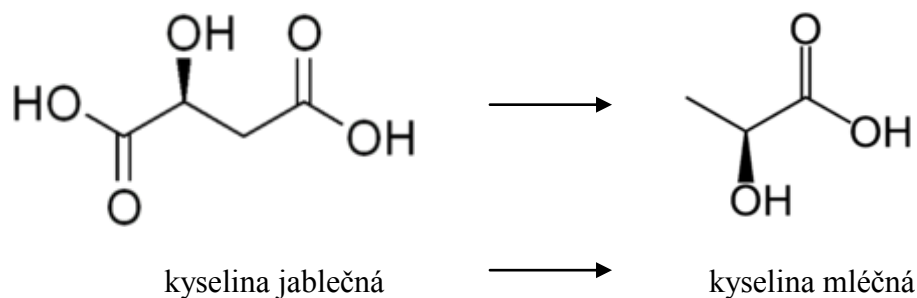
Víno v malých nádobách a zejména v dřevěných sudech rychle zraje a jeho kvalita se delším ležením snižuje. Proto včasným stočením do láhví zůstane víno svěží a zachovají se buketní látky. [6] Na druhou stranu víno musí být dostatečně vyzrálé a vyškolené, aby nedocházelo ke tvorbě zákalů a pozdějším senzoričtým změnám. [4] Vhodnost skladování zjistíme jednak chuťovou zkouškou a jednak ponecháním např. ve skleničce v teple na vzduchu. Víno způsobivé ke skladování se v těchto podmínkách nezakalí ani nezmění barvu. Další zkouškou je teplený test, a to zahřátím vína na 70 °C. Zde se zjišťuje barevná stabilita a to, zda nedojde ke srážení bílkovin. Důležitá je taktéž zkouška na vysrážení vinného kamene. To zjišťujeme ponecháním vína 4 – 5 dní při 2 °C. Poté protřepáním vína v láhvi a obrácením se pozoruje proti světlu, zda v láhvi plave vysrážený vinný kámen. Řešením tohoto problému je přídavek kyseliny metavinné do vína před stáčením. [6]

Nejčastěji je víno plněno do 0,75 l láhví typu „bordó“. Pro uzavírání především červených vín se hodí typické korkové zátky. Důvodem je velmi jemná mikrooxidace, která přes zátku probíhá a pozitivně ovlivňuje kvalitu červeného vína. [3] Dalšími možnostmi jsou plastové zátky a korunkové a šroubovací uzávěry. [2]

2 JABLEČNO-MLÉČNÉ KVAŠENÍ

Na základě metabolické aktivity mléčných bakterií může ve víně probíhat tzv. jablečno-mléčné kvašení (dále označované JMK). [3] Tento proces je rovněž nazýván jako biologické nebo bakteriální odbourávání kyselin, či malolaktické kvašení. [2] JMK je tradiční vinařskou technikou u výroby bílého a červeného vína. [8] V našich zeměpisných podmínkách se však používá hlavně při výrobě vína červeného. [3]

JMK je vyvoláno bakteriemi, a tak se ve skutečnosti nejedná o kvašení, přesto se toto označení celosvětově používá. [3] Dle definice JMK ve víně jde o enzymatickou přeměnu kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou [9] za uvolnění oxidu uhličitého. Jedná se tedy o dekarboxylaci. [10] Enzym způsobující tuto přeměnu se nazývá malolaktický, nebo také jablečno-mléčný enzym. [11]



Obr. 1. Rovnice malolaktického kvašení

K procesu JMK nejčastěji dochází sekundárně, po alkoholovém kvašení, ale může probíhat i současně s ním. [9]

Cílem transformace těchto kyselin je snížení kyselosti vína a dosažení požadované chuti a aroma vína. U vín vyprodukovaných v chladnějších oblastech, obsahujících zpravidla větší množství kyseliny jablečné (na úkor kyseliny vinné), je proto velmi žádoucí JMK zařadit do technologického procesu výroby. [12] Správně provedené JMK má rovněž pozitivní efekt na budoucí mikrobiologickou stabilitu vína. [1]

Při JMK po odbourání kyseliny jablečné dochází k odbourání dalších kyselin, například kyseliny citronové, a dále potom cukru. [2] Vznikají tak další produkty ovlivňující chuť a aroma vína, [1] a to jak pozitivně, tak negativně. [2]

2.1 Bakteriální kultury jablečno-mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení rozdělujeme na homofermentativní a heterofermentativní, kdy produkty mléčného kvašení jsou v prvním případě pouze kyselina mléčná a oxid uhličitý a v druhém vznikají navíc ještě etanol a další metabolity. [12]

Mléčné bakterie JMK náležejí rodům *Oenococcus*, *Lactobacillus* a *Pediococcus*. Bakterie rodu *Oenococcus* jsou heterofermentativní, fakultativně anaerobní, grampozitivní koky. Zástupce tohoto rodu *Oenococcus oeni* je nejčastěji používaná kultura JMK. Jako jediný vyvolává malolaktické kvašení i u vín s velmi nízkým pH ($\text{pH} \leq 3,5$). [12] *O. oeni* optimálně roste při teplotě 18 – 30 °C a $\text{pH} = 4,8$. [9] Dříve byl tento mikroorganismus klasifikován jako *Leuconostoc oenos* [13] a byl jediným acidofilním zástupcem rodu *Leuconostoc*, později byl ale přidělen novému rodu *Oenococcus*. [14] Rod *Lactobacillus* zastupují homofermentativní či heterofermentativní, fakultativně anaerobní, grampozitivní tyčinky. Rod *Pediococcus* charakterizují homofermentativní, fakultativně anaerobní, grampozitivní tyčinky. [9] V praxi je z nich používán nejvíce kmen bakterií *Lactobacillus plantarum*, jehož výhodou je absence nežádoucích tónů po odbourávání kyselin. Naopak nedostatkem je neúplné odbourání kyseliny jablečné. Důsledkem je zastavení činnosti bakterií, protože *Lactobacillus plantarum* špatně snáší alkohol. Z tohoto důvodu je vhodné přidávat jej do vína před kvašením. [2]

Mléčné bakterie potřebují mimo zdroj energie (kyselinu jablečnou) další živiny, jako jsou aminokyseliny, nenasycené mastné kyseliny a vitaminy. Proto vína, která vykazovala problémy při kvašení nebo pocházející ze stresovaných vinic, nejsou vhodná pro JMK. [2]

Bakterie náležející zmíněným rodům mikroorganismů se nacházejí v čerstvém moštu v poměrně malém počtu ($10^3 - 10^4$ bakterií/ml) a v průběhu alkoholového kvašení jsou tyto kmeny téměř neaktivní. Teprve při koncentraci $3 - 10^6$ bakterií/ml začíná vznikat kyselina mléčná. [2] Nejvýhodnějším způsobem provedení JMK je inokulace čistou kulturou bakterií *Oenococcus oeni*. Použití čistých bakteriálních kultur umožňuje producentům správné

načasování JMK a částečné ovlivnění odbourávání kyseliny jablečné. Tyto kultury mají rovněž pozitivní vliv na chuť a aroma vína. [3]

Startovací kultury JMK jsou komerčně dodávány jako lyofilizované preparáty. [9]

2.2 Faktory ovlivňující jablečno-mléčné kvašení

Proces JMK ovlivňuje několik faktorů. Patří mezi ně zejména hodnota pH moštu nebo vína, jeho teplota a obsah oxidu siřičitého. [3]

2.2.1 Hodnota pH

Hodnota pH je jedním z nejvýznamnějších faktorů ovlivňující průběh JMK. [3] Předpokladem provedení JMK je hodnota $\text{pH} > 3,1$. Při nižším pH totiž nedochází prakticky k žádnému množení bakterií *Oenococcus oeni* [3] (pokud je třeba pH zvýšit, pro mírné odkyselení se použije uhličitan vápenatý). [2] Je žádoucí udržovat hodnotu pH přibližně v rozmezí 3,3 – 3,5, protože tehdy se mohou množit pouze žádoucí bakterie *Oenococcus oeni*. [3] Obecně platí, že čím nižší je kyselost vína před aplikováním bakteriálních kultur JMK, tím menší je riziko vytvoření nežádoucích produktů negativně ovlivňující výslednou chuť a aroma vína. Při $\text{pH} > 3,5$ se stávají dominantními bakterie rodů *Pediococcus* a *Lacobacillus*, a dochází tak k tvorbě nadměrného množství nežádoucích máslových, sýrových, mléčných, octových aj. aromat. Může dojít až k odbourání kyseliny vinné. [12]

2.2.2 Teplota

Přestože je optimální růst mléčných bakterií přibližně 27 °C, ve víně je omezen na asi 15 – 20 °C, přičemž teplotní optimum pro *Oenococcus oeni* je 20 - 22 °C. Nicméně při běžných anaerobních podmínkách tato teplota závisí ještě na koncentraci oxidu siřičitého a etanolu a dalších inhibítorech. [10] Nízké teploty inhibují průběh JMK. Například při teplotách nižších než 15 °C je *Oenococcus oeni* téměř neaktivní. [15] V případě potřeby ohřevu vína je vhodné použít infračervený ohříváč, jehož předností je, že nezpůsobuje lokální přehřátí, a tudíž neškodí živým bakteriím. [2]

2.2.3 Obsah oxidu siřičitého

Obsah oxidu siřičitého je velmi významným faktorem ovlivňující JMK. SO_2 je velmi dobrý inhibitor všech bakterií, včetně mléčných bakterií. [3] Doporučená koncentrace cel-

kového množství SO_2 je max. 50 mg/l. [15] Vázaný SO_2 má přibližně 5 – 10 x menší anti-mikrobní vlastnosti než volný SO_2 , [3] proto i přídavek přibližně 10 mg/l může zabránit růstu mléčných bakterií ve víně. [15]

2.3 Vliv jablečno-mléčného kvašení na organoleptické vlastnosti vína

Jak už bylo výše napsáno, nejdůležitějším dějem JMK je transformace kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou. [9] S tím související ztráta kyselosti s sebou nese rovněž změnu chuťového charakteru vína. Nevyzrálá chuť kyseliny jablečné se mění v harmoničtější a plnější chuť kyseliny mléčné. [2]

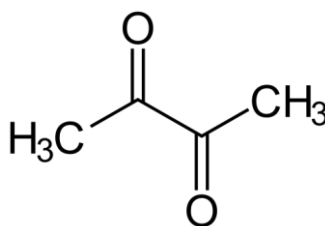
2.3.1 Tvorba diacetylu a jeho smyslové vnímání ve víně

Nejvýznačnější změny aroma vína jsou spojeny s produkcí diacetylu. Tato látka je hlavním nosičem aroma během JMK. [11] Diacetyl je obecně považován za látku dodávající charakteristickou chuť a aroma másla. [16] V nízkých koncentracích ve víně je jeho aroma popisováno jako kvasnicové, oříškové a ve vyšších jako máslové či karamelové. [10], Konkrétní vjem vždy závisí na dalších složkách ovlivňujících chuť/aroma daného vína. [17] Jako přijatelná je považována hranice 1 – 4 mg/l, [10] více než 5 mg/l je bráno jako vada. [9] Diacetyl je produktem metabolismu kyseliny citronové, která je rozkládána všemi používanými rody bakterií mléčného kvašení. [18] Výhodou nejčastěji používané bakterie *Oenococcus oeni* je to, že kyselinu citronovou metabolizuje pomaleji, než rozkládá kyselinu jablečnou, a proto je menší riziko toho, že vznikne diacetylů přespříliš. [11] Podrobnější charakteristika diacetylu bude popsána v další kapitole.

3 DIACETYL A JEHO CHARAKTERIZACE

3.1 Chemická struktura diacetylu

Diacetyl, někdy také označovaný jako biacetyl, [19] je jednoduchá organická molekula. Její systematický název je 2,3 – butadion [20] a vzorec je $C_4H_6O_2$. [19] Jedná se o karbonylovou sloučeninu, konkrétně dikarbonylovou, dioxosloučeninu, či diketon, jelikož na druhém a třetím uhlíku obsahuje karbonylovou skupinu. Ještě přesněji jde o α -dikarbonylovou sloučeninu, jelikož mezi dvěma karbonylovými sloučeninami není žádný volný atom uhlíku (dle tohoto klíče jsou dále rozlišovány β a γ -dikarbonylové sloučeniny). [21]



Obr. 2. Diacetyl – strukturní vzorec

3.2 Vlastnosti diacetylu

Diacetyl je žlutá kapalina [21] ostrého máslového zápachu, [22] dávající potravinám máslovou chuť a aroma. [23] Jak už bylo výše napsáno, diacetyl je ve víně produkován některými druhy bakterií mléčného kvašení. Dodává však chuť a aroma dalším potravinám, především fermentovaným mléčným produktům. [10] Diacetyl vzniká v menším množství jako vedlejší produkt rovněž při fermentaci piva. V pivě není jeho přítomnost žádoucí, a proto se pivo nechává dokvášet. Při tomto procesu je diacetyl redukován na acetoin a následně na 2,3 – butandiol, který již nemá tak špatný vliv na organoleptické vlastnosti piva. [20] Diacetyl je v pivu běžně obsažen přibližně v množství 0,05 mg/l. Výjimkou mohou být některá černá piva, která mohou obsahovat až 0,6 mg/l. Množství větší než 1,0 mg/l je bráno jako vada. [24] V porovnání s vínem je to pětina množství (viz. 2.3.1.) Pro svou

chuť a aroma je diacetyl rovněž přidáván do řady potravin, jako například do margarínů nebo popcornu. [20]

Tab. 4. Vlastnosti diacetylu [25,26,27,28]

C ₄ H ₆ O ₂	
Molární hmotnost [g/mol]	86,0892
Bod tuhnutí [°C]	-2,4
Bod varu [°C]	88
Hustota [g/cm ³]	0,99
Práh rozpoznání [mg/m ³]	0,09*
pH 30% roztoku	3,2

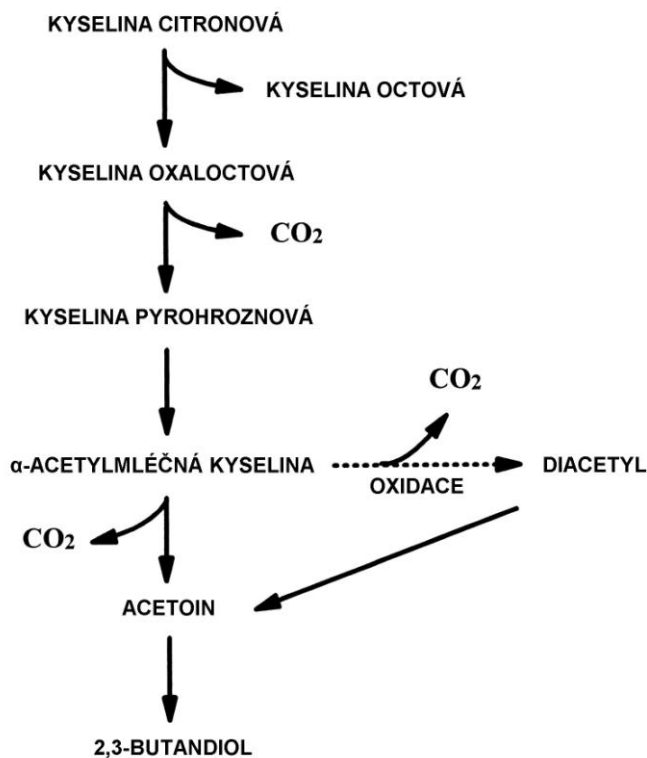
* ve víně se práh rozpoznání velmi odvíjí od druhu a stylu vína. Dle Martineau a kol. (1995) je tento práh u bílých vín 0,2 mg/l (Chardonay) a v rozmezí 0,9 – 2,8 mg/l (Rulandské modré a Cabernet Sauvignon) u červených vín. [17] Pro srovnání u piva je za práh rozpoznání považováno rozmezí hodnot 0,1 - 0,15 mg/l. [29]

3.3 Smyslové vnímání diacetylu ve víně

Aroma a chuť, kterou diacetyl vínu dodává, byla popsána v kapitole 2.3.1.

3.4 Metabolismus kyseliny citronové

Kyselina citronová je ve víně obsažena v množství 250 – 300 mg/l. V závislosti na rychlosti průběhu JMK se její obsah snižuje na 100 – 0 mg/l. [11] Při JMK je kyselina citronová ve dvou krocích přeměněna na kyselinu pyrohroznovou. Nejprve je transformována na kyselinu oxaloctovou a octovou. Tato reakce je katalyzována enzymem citrátlyása. Následně je oxaloctová kyselina přeměněna na kyselinu pyrohroznovou pomocí oxalacetátdekarboxylázy. Diacetyl poté vzniká jako meziproduct při dekarboxylaci kyseliny pyrohroznové na 2,3-butandiol, konkrétně při oxidační dekarboxylaci α -acetylmléčné kyseliny. [30] Diacetyl je dále pomocí *O.oeni* přeměňován na acetoin a 2,3-butandiol. [18] Kyselina pyrohroznová (meziproduct při JMK, při přeměně kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou) je obvykle přeměňována na kyselinu mléčnou, avšak pokud je přítomná „další“ kyselina pyrohroznová vznikající z kyseliny citronové, vzniká jako produkt diacetyl, acetoin a 2,3-butandiol. [11] Metabolismus kyseliny citronové znázorňuje obrázek 3.



Obr. 3. Metabolismus kyseliny citronové (vino, *Oenococcus oeni*)

Množství diacetylu (acetoinu) a kyseliny octové ve víně závisí na rychlosti JMK. V případě rychlého průběhu JMK se z kyseliny citronové vytváří větší množství kyseliny octové, a to na úkor diacetylu a acetoinu. Naopak při pomalém množení mléčných bakterií vzniká méně kyseliny octové a více diacetylu a acetoinu. [11]

Acetoin a 2,3-butandiol neovlivňují chuť/aroma vína, protože jejich meze rozpoznatelnosti leží vysoko, přibližně 150 a 600 mg/l a v takových koncentracích se víně nevyskytují. [10]

3.5 Faktory ovlivňující množství diacetylu ve víně

Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují množství diacetylu ve víně. Patří zde druh kultury mléčných bakterií používaný pro JMK, dávka inokula těchto bakterií, druh vína, přítomnost živých kvasinek, kontakt vína s kyslíkem, koncentrace oxidu siřičitého a kyseliny citronové, teplota a pH v průběhu JMK či přítomnost zkvasitelných cukrů ve víně. [10]

3.5.1 Výběr bakteriální kultury a dávka inokula

Každý výrobce komerčních kultur bakterií pro nastartování JMK udává informace týkající se použití a účinku daného výrobku. Avšak tyto účinky jsou velmi závislé na výše uvedených faktorech, a tak některé bakterie mohou produkovat větší množství zbytkové koncentrace diacetylu. Většina komerčně dodávaných kultur je, s ohledem na požadavky výrobců vína, takového charakteru, že buď nepodporuje vůbec vznik diacetylu, nebo jen v malém množství. [10]

Dávka inokula mléčných bakterií rovněž ovlivňuje tvorbu diacetylu. Bylo zjištěno, že nižší dávka způsobuje vyšší produkci diacetylu ve víně, což potvrzují výsledky experimentů například na odrůdě vína Rulandské modré. Byly použity dvě rozdílné koncentrace bakteriálních kultur *Oenococcus oeni* (2×10^4 CFU/ml a 2×10^6 CFU/ml), přičemž počáteční koncentrace diacetylu měla hodnotu 0,5 mg/l. Po proběhnutí JMK obsahovalo víno naočkované nižší koncentrací bakterií 3,9 mg/l diacetylu, přičemž víno s vyšší koncentrací inokula 1,7 mg/l. [10]

3.5.2 Teplota a pH při jablečno-mléčném kvašení

V případě teploty existuje velmi málo ověřených informací souvisejících s akumulací diacetylu. Avšak De Revel a spol. (1989) ve svém výzkumu zaznamenává větší množství vytvořeného diacetylu při očkování při teplotě 18 °C než při 25 °C. K potvrzení této závislosti by však bylo třeba dalšího zkoumání. [10]

Co se týče pH, bylo zjištěno, že při nižším pH dochází ke zvýšené tvorbě diacetylu, zatímco vyšší pH podporuje tvorbu kyseliny octové. [10]

3.5.3 Koncentrace kyseliny citronové a oxidu siřičitého

Vyšší koncentrace kyseliny citronové má za důsledek zvýšení produkce diacetylu. Pokud je kyselina citronová do moštu či vína přidávána, měl by se brát zřetel na zvýšenou produkci dalších produktů ovlivňujících chuť/aroma, jako například kyseliny octové. [10]

Oxid siřičitý je velmi dobrým inhibítozem mléčných bakterií. [12] Jeho spojitost s diacetylem je však složitější. Zpočátku SO_2 redukuje množství volného diacetylu ve víně, avšak s jeho vyprcháním naopak podporuje typické máselné aroma diacetylu. V průběhu skladování vína se tak vlivem snižování koncentrace SO_2 máselné aroma rozvíjí. [10]

3.5.4 Kontakt moštu s kyslíkem a usazeninami kvasinek během jablečno-mléčného kvašení

Přeměna α -acetolaktátu na diacetyl je co do reakce neenzymatická dekarboxylace, která je podpořena přístupem kyslíku. [10] Proto přítomnost kyslíku zapříčiňuje zvýšenou tvorbu diacetylu ve víně. [31]

Vinné kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* mají schopnost diacetyl syntetizovat i redukovat. V průběhu JMK přítomnost usazenin kvasinek snižuje množství diacetylu. Z tohoto důvodu je důležité správné načasování JMK. Záleží jen na tom, zda je žádoucí, aby diacetyl ovlivnil aroma/chuť daného vína. [10]

3.6 „Popcorn lung disease“

Diacetyl je běžnou aromatizující látkou dodávanou do potravin kvůli svému typickému máslovému aroma. [32] Jednou z těchto potravin je popcorn. Diacetyl však není z toxikologického hlediska úplně bezpečná látka a jeho chronické působení přináší zdravotní rizika. [20] Aromatické látky včetně diacetylu jsou obecně velmi těkavé, a tak je možné je snadno vdechnout. V roce 2000 se ve státě Missouri stal případ, kdy v závodě na výrobu máslového popcornu byla u deseti pracovníků diagnostikována obliterativní bronchiolitis. [33] Jde o závažné onemocnění dolních cest dýchacích, [34] které může být způsobeno diacetylem. Mezi projevy této nemoci patří zhoršující se suchý kašel, sípání a dušnost. V těžkých případech se někdy musí přikročit i k transplantaci plic. [35] Na základě této události byla zkoumána toxicita par diacetylu na potkanech. Po inhalování par diacetylu byly zaznamenány změny na nosních sliznicích potkanů, na sliznicích pracovníků však tyto změny pozorovány nebyly. Důvodem onemocnění ale mohly být vyšší koncentrace vdechovaných par diacetylu pracovníky v závodě než při experimentu s potkany. [20] Přesto, že je diacetyl dle FDA (Food and Drug Administration) zařazen mezi bezpečné látky sloužící k aromatizaci, existují důkazy o nebezpečnosti jeho vdechování ve větším množství. Některé firmy, včetně společnosti ConAgra (největší americký výrobce popcornu), se rozhodly diacetyl ve své výrobě nepoužívat. [36]

Tomuto ojedinělému onemocnění se tak začalo říkat „popcorn lung disease“ nebo také „popcorn worker lung“, [35] v překladu něco jako popcornové onemocnění plic.

4 METODY STANOVENÍ DIACETYLU

Diacetyl je možné stanovat různými instrumentálními metodami. Mezi tyto metody patří kolorimetrie, polarografie, vážkové stanovení, spektrofotometrie, fluorimetrie, a především kapalinová a plynová chromatografie. [10]

4.1 Kolorimetrie

Kolorimetrie je optická metoda. Intenzita charakteristického zbarvení zkoumané látky závisí na její koncentraci v roztoku. Porovnáním absorbancí roztoku vzorku s absorbancí roztoku standardu se zjistí množství obsažené látky. [37] Kolorimetrické stanovení diacetylů je založeno na reakci diacetylů s keratinem v přítomnosti α -naftolu. Nevýhodou tohoto stanovení je však možnost zkreslení výsledku acetoinem, jehož vlnová délka absorpce je stejná jako u diacetylů, a je tak složité je určit individuálně. [10]

4.2 Polarografie

Polarografie je analytická metoda, (za jejíž objevení dostal Jaroslav Heyrovský v roce 1959 Nobelovu cenu), [38] jejímž principem je sledování závislosti proudu na vkládaném napětí v elektrochemickém článku, složeném z nepolarizovatelné (referenční) a polarizovatelné (měrné) elektrody. Jsou použity rtuťové elektrody s obnovitelným povrchem. [39] Polarograficky je diacetyl snadno stanovován po kondenzaci s o-fenylendiaminem. [40]

4.3 Vážkové stanovení

Vážkové stanovení diacetylů je založeno na jeho reakci s hydroxylaminem, kdy vzniká dioxim, který v interakci s nikelnatými ionty v kyselém prostředí vytváří sraženinu nikelnatého chelátu, jež se odfiltruje, následně vysuší a zváží. [41]

4.4 Spektrofotometrie

Další variantou je spektrofotometrické stanovení, [42] kdy se nepoužívá sraženina nikelnatého chelátu, ale jeho roztok, u kterého se změří absorpce. [41] Principem absorpční spektrofotometrie je zjištění absorpce světla při průchodu vrstvou roztoku. Jeho koncentrace se poté vypočítá z Lambertova-Beerova zákona.

4.5 Fluorimetrie

Fluorimetrie je metoda využívaná k analýzám organických sloučenin ve formě roztoku. Pomocí ní se měří fotoluminiscenční záření vysílané molekulami, excitovanými ultrafialovým nebo viditelným zářením, při návratu do základního stavu. [39] V kyselém prostředí dochází k reakci diacetylu s isonikotinhydrazidem za vzniku hydrazinu, který spolu se zirkoničitými solemi utváří fluorescenční komplexy. [43]

4.6 Chromatografie

Chromatografie je separační analytická metoda, při které jsou oddělovány (separovány) složky obsažené ve vzorku. Principem je vnesení vzorku mezi dvě navzájem nemísitelné fáze. Nepohyblivá fáze se nazývá stacionární a pohyblivá fáze mobilní. Vzorek se umístí na začátek stacionární fáze. Mobilní fází je vzorek unášen přes stacionární fázi, na které dochází k zachycování složek vzorku. Složky, které jsou silněji poutány na stacionární fázi, se tak v pohybu více zdržují. Tímto dochází k postupné separaci a na konec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zadržované. [44]

Z důvodu velké různorodosti chromatografických metod se tyto dělí podle několika hledisek. [44] Dle skupenství mobilní fáze rozdělujeme chromatografické metody na kapalinovou chromatografii a plynovou chromatografii. [45] Podle uspořádání stacionární fáze rozlišujeme kolonovou chromatografii (stacionární fáze je umístěna v trubici - koloně), papírovou chromatografii (stacionární fáze je součástí chromatografického papíru) a tenkovrstvou chromatografii (stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladě – např. hliníkové fólii či skleněné desce). Poslední dělení je podle povahy převládajícího děje při separaci. Patří sem rozdělovací, adsorpční, iontově-výměnná, afinitní a gelová chromatografie.

U rozdělovací chromatografie o separaci rozhoduje rozdílná rozpustnost složek ve vzorku v kapalně stacionární fázi a kapalně nebo plynně mobilní fázi. Adsorpční chromatografickou metodu charakterizuje rozdílná schopnost složek adsorbovat se na povrch stacionární fáze (tuhá látka). U iontově-výměnné chromatografie o separaci složek rozhodují různé velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze a ionty vzorku. Při použití gelové chromatografie se složky separují podle velikosti na pórovitém

gelu (stacionární fáze). U afinitní chromatografie stacionární fáze váže ze vzorku ty složky, ke kterým má afinitu (úzce selektivní vztah). [44]

4.6.1 Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Význačnou metodou kapalinové chromatografie je technika HPLC. Tato zkratka značí „High Performance Liquid Chromatography“, v překladu vysoce účinnou kapalinovou chromatografií. [46]

Během separace je analyt rozdělován mezi stacionární a mobilní fázi. Čas, který stráví v jedné nebo druhé fázi, závisí na jeho afinitě ke každé z nich. [44]

Metodu HPLC můžeme rozlišovat jako tzv. „normální“ a „reversní“. Při normální HPLC je stacionární fáze polárnější než mobilní fáze. U reversní HPLC metody je tomu naopak. Druhá jmenovaná metoda je více používaná, anglicky je označovaná jako Reverse Phase HPLC. [46]

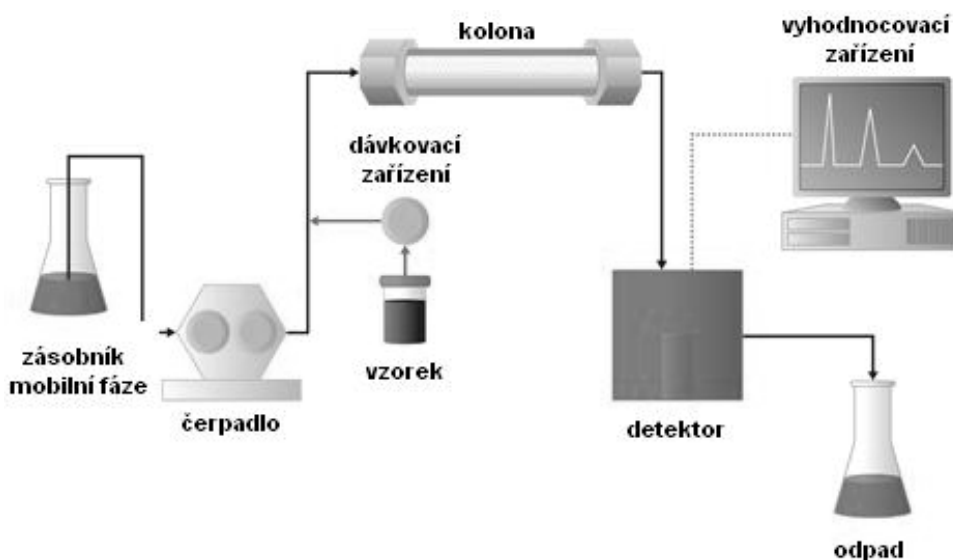
U kapalinové chromatografie se obvykle pracuje eluční metodou. Ta je založena na vymývání vzorku nosnou mobilní fází. Vzorek se dávkuje najednou do proudu mobilní fáze před vstupem do kolony. Z kolony vychází nejdříve ta složka, která se na stacionární fázi zachycuje nejméně. Čas, který molekula dané složky stráví v koloně, je pro ni za daných experimentálních podmínek charakteristický a identifikující, nazývá se retenční čas. Vzniklý chromatogram je tvořen řadou elučních křivek, neboli piků. Kvantitativní zastoupení složky určuje plocha uzavřená jejím pikem. Mobilní fáze při eluční metodě se nazývá eluent, z kolony vychází eluát. [44]

Jako mobilní fáze se používají běžná rozpouštědla nebo jejich směsi. [39] Při izokratické eluci je mobilní fáze tvořena jednou látkou. Při gradientové eluci ji tvoří směs látek, jejichž poměr se v průběhu procesu mění tak, aby se zvyšovala její eluční síla (schopnost vymývání vzorku). [47]

Stacionární fáze je tvořena mikročásticemi silikagelu, na kterých jsou navázány například nepolární uhlovodíky (C8, C16) nebo polárnější uhlovodíky s nitrilovou funkční skupinou. [46]

4.6.1.1 Schéma a popis kapalinové chromatografie

Přístroj, na němž se chromatografická separace provádí, se nazývá chromatograf. [48] Na obr. 4. je znázorněno schéma kapalinové chromatografie. Mobilní fáze je vháněna vysokotlakou pumpou (čerpádlem) do chromatografické kolony, odtud pokračuje přes detektor do odpadní nádoby. Do proudu mobilní fáze je pomocí dávkovacího zařízení vnese-no přesné množství analyzovaného vzorku. Mobilní fáze následně unáší vzorek do kolony, kde se odehrává vlastní separace jednotlivých složek vzorku. Výstup z kolony vede dále do detektoru, kde jsou jednotlivé složky detekovány. Signál detektoru je zaznamenáván pomocí vyhodnocovacího zařízení (nejčastěji PC) a ukládán v podobě chromatogramu. [46]



Obr. 4. Schéma kapalinového chromatografu [49]

Čerpadlo – jako zdroj průtoku mobilní fáze se používají vysokotlaká čerpadla, [39] (pístová nebo membránová), [44] jejichž rysem je to, že zachovávají konstantní průtok i za vysokých tlaků a malých hodnot průtoku. Při práci s vyššími tlaky je třeba před čerpadlo zařadit krok mobilní fáze. Důvodem je přítomnost mikrobublinek. Ty jsou za atmosférického tlaku v mobilní fázi rozptýleny. Při zvýšeném tlaku se ale rozpustí, avšak po výstupu z kolony se opět uvolňují, což znemožňuje funkci detektoru. Odplynění se provede nejčastěji rychlým zahřátím rozpouštědla pod teplotu jeho bodu varu. [39]

Dávkovací zařízení – v současné době se používají dva způsoby vnášení vzorku do kolony, a to dávkování injekční stříkačkou a obtokovým dávkovacím kohoutem. Nevýhodou dávkování pomocí injekční stříkačky je především riziko zanesení stop materiálu ze stříkačky. Provádí se ručně nebo automaticky. [44] Nejběžnější dávkovací zařízení jsou dávkovací ventily se smyčkou a autosamplery. [50] Výhodou autosamplerů (automatických dávkovačů) je nepotřebnost obsluhy dávkování.

Kolony – chromatografická kolona je trubice naplněná stacionární fází. [50] Materiál, z něhož jsou kolony zhotoveny, musí být odolný jak proti vysokým tlakům, tak i chemicky. [39] Nejčastěji se používají kolony nerez-ocelové, [44] dále plastové (PEEK) nebo skleněné. [50] Kolony pro analytické využití mají zpravidla 10, 15, nebo 25 cm, vnitřní průměr 4,6 nebo 5,0 mm. Běžný průtok eluentu je 1 – 2 ml/min.

Detektory – u HPLC metody se používá několik druhů detektorů vzájemně se lišících v mnoha parametrech. Mezi ně patří například princip funkce, konstrukce, selektivita, citlivost či meze detekce. [46] Nejpoužívanějšími detektory v HPLC metodě jsou fotometrický, refraktometrický a fluorescenční detektor. [44] Nejběžnějším je fotometrický detektor (UV/VIS), který je založen na absorpci viditelného nebo ultrafialového záření. Jde o selektivně pracující detektor a jeho citlivost je závislá na typu detekované látky a použité vlnové délce. [39] Jednodušší detektory měří při jedné vlnové délce, nejčastěji 253,7 nm, a používají jako zdroj záření rtuťovou výbojku. [50] Složitější přístroje umožňují nastavení vlnové délky pomocí monochromátoru. Nejdokonalejší detektory jsou schopny pomocí diodového pole proměřit absorpční spektrum v zadané oblasti vlnových délek. Tyto se označují jako DAD detektory (Diode Array detector). [44] Výhodou fotometrických detektorů je malá citlivost na změnu teploty a průtoku mobilní fáze. [39] Co se týká rozsahu analyzovaných látek, je jeho nevýhodou neschopnost zaznamenávat nasycené uhlovodíky, naopak je velmi vhodný pro detekci aromatických uhlovodíků. [48] Refraktometrický detektor je založen na měření rozdílu indexu lomu čisté mobilní fáze a mobilní fáze vycházející z kolony. [39] Jeho výhodou je větší univerzálnost, avšak není příliš citlivý. [44] Fluorescenční detektor je konstrukčně podobný fotometrickým detektorům [48] a je založen na principu fluorescence – schopnosti látek absorbovat UV záření a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření. Je vysoce selektivní a vhodně kombinovatelný s fotometrickým detektorem. Mezi další používané detektory patří FTIR detektor (univerzální detektor zpracovávající infračervená spektra složek

v mobilní fázi), dále elektrochemické detektory (používané tam, kde jsou v roztocích obsaženy složky redukovatelné nebo oxidovatelné na polarizované elektrodě) a hmotnostní spektrometr (používaný především u plynové chromatografie). [44]

Vyhodnocovací zařízení – nejčastěji PC, který provede vyhodnocení. Výsledkem měření je chromatogram.

Stanovení diacetylu ve víně bude popsáno v metodice praktické části práce.

4.6.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (Gas Chromatography) se od kapalinové odlišuje skupenstvím mobilní fáze. Tou je v tomto případě nosný plyn. Ten unáší dávkovaný vzorek kolonou. Aby mohl být vzorek transportován, musí se ihned přeměnit na plyn [44] (vzorek je vstříknut do vyhřívaného prostoru, kde dochází k odpaření). [39] Obecně může být metoda použita k separaci plynů, většiny nedisociovaných kapalin a pevných organokovových molekul i mnoha organokovových látek. [44]

Co se týče stanovení diacetylu pomocí plynové chromatografie, existuje více možností. [10] Jednou z nich je derivatizace diacetylu 4,5-dichloro-1,2-diaminobenzenem za vzniku 6,7-dichloro-dimetylquinoxalinu, který se po extrakci v benzenu stanovuje plynovou chromatografií s hmotnostně spektrometrickým detektorem. Tato metoda je přímo vhodná pro analyzování diacetylu ve víně [29] i pivu. [51] Další možností stanovení diacetylu je použití plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem. [10] Vzorek obsahující diacetyl je zředěn 5% roztokem etanolu, centrifugován a následně proměřen. [52] Dle Hayasaky a Bartowsky se zdá být nejlepší metodou pro stanovení diacetylu ve víně použití mikroextrakce na tuhou fázi (SPME – Solid Phase Microextraction*) v kombinaci s plynovou chromatografií s hmotnostně spektrometrickou detekcí (jako vnitřní standard se použije diacetyl-D6). Výhodou této metody je limit detekce diacetylu pouhých 0,01 µg/ml až po 10 µg/ml. [53]

* SPME je jednoduchá a účinná sorpčně/desorpční technika zakoncentrování analytu [54] určená také pro analýzu chuťových a vonných látek. [53]

5 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo v teoretické části zaměřit se na proces výroby červeného vína, popsat vznik diacetylu jako parametru jakosti vína při jablečno-mléčném kvašení a v neposlední řadě charakterizovat diacetyl a metody jeho stanovení.

Praktická část spočívala v analyzování a vyhodnocení vývoje množství diacetylu v průběhu jablečno-mléčné fermentace obsaženého ve vzorcích vína připravených různou technologií.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 METODIKA PRÁCE

6.1 Použité chemikálie

- 85% kyselina ortofosforečná (Penta)
- Standard diacetylu (Sigma Aldrich)
- Redestilovaná voda

6.2 Pomůcky a přístroje

- HPLC aparatura Hewlett Packard series 1100
 - Odplyňovací zařízení G1322A
 - Binární pumpy G1312A
 - Termostat kolon G1316A
 - Dávkovací ventil se smyčkou (20 μ l)
 - Kolona Aminex HPX-87H Ion Exclusion Column (300 mm x 7,8 mm)
 - Detektor UV/VIS DAD G1315A
 - PC s vyhodnocovacím programem ChemStation – Instrument 1 (Agilent, USA)
- Dávkovací injekční stříkačka 50 μ l (Hamilton, USA)
- Mikrofiltry MS® Nylon Syringe Filter 13 mm x 0,45 μ m (Chromservis s.r.o.)
- Běžné laboratorní vybavení (laboratorní sklo a pomůcky)

6.3 Metoda stanovení diacetylu ve víně

Předlohou stanovení byl článek *Ion-exchange HPLC of Cheese-related Organic Acids in Comparison with Reverse-phase HPLC*, jehož autory jsou J. F. R. Lues a spol., a který byl uveden v časopise *International Dairy Journal* - Elsevier (1998, 8 (12)). [55] V článku je popisováno a porovnáváno stanovení organických kyselin a diacetylu pomocí iontově-výměnné HPLC a klasické reversní HPLC. Metoda iontově-výměnné HPLC se jeví jako vhodnější pro stanovení organických kyselin a především pro stanovení diacetylu jako

jediná správná (J. F. R. Luesovi a spol. se totiž nepodařilo změřit koncentraci diacetylu ve vzorku pomocí klasické reversní HPLC – použita kolona Zobrax ODS 4,6 mm x 250 mm). Dle výše uvedeného byla pro stanovení diacetylu ve vzorcích vína použita metoda iontově-výměnné HPLC s UV detekcí.

6.4 Analyzované vzorky vína

Pro analýzu byly použity vzorky vín pocházející od dvou různých distributorů (vinařů). Společné pro tyto dva distributory je shodná vinařská oblast – Morava, podoblast – Slovácko, a dokonce i stejná vinařská obec – Polešovice. Od obou byly odebírány vzorky vína dvou odrůd – Cabernet Moravia a Zweigeltrebe.

Tyto odběry začaly po ukončení fáze hlavního alkoholového kvašení. Byly odebírány vždy dva vzorky dané odrůdy v jeden čas, přičemž se lišily tím, že jeden vzorek byl zaočkován bakteriální kulturou pro vyvolání JMK, a druhý ne.

Od prvního distributora (dále označován jako vinař č.1) byly vzorky obou odrůd odebírány každé 3 dny, a to v měsíci prosinci 2010 a lednu 2011. Bylo tak odebráno celkem 22 vzorků každé odrůdy (11 zaočkovaných a 11 nezačkovaných). Od druhého distributora (dále vinaře č.2) byl odebrán stejný počet vzorků, avšak v intervalu 14 dní. Jednotlivé odrůdy se navíc časově lišily v odebírání vzorků. Zatímco vzorky vína Cabernet Moravia byly odebírány v rozmezí říjen 2010 – březen 2011, vzorky Cabernet Moravia v období listopad 2010 – duben 2011.

6.4.1 Použitá kultura bakterií

Pro očkování vína byla použita komerční kultura BIOSTART® FORTE SK2. Jedná se o koncentrovanou kulturu bakterií pro nastartování biologického odbourávání kyselin v bílém a červeném víně. Je to zamražený a sušený preparát vybraný z kmenu *Oenococcus oeni*. Mezi podmínky použití tohoto výrobku patří: obsah volného SO₂ nepřekračující 15 mg/l, maximální obsah volného SO₂ 45 mg/l, pH > 3, teplota vína > 14 °C a obsah alkoholu maximálně 14,5 %. Očkovat se doporučuje až po alkoholovém kvašení, tak aby obsah zbytkového cukru nebyl vyšší než 4 g/l. [56]

6.4.2 Úprava vzorků před stanovením

Před stanovením byly vzorky uchovávány zamražené v tmavých neprůhledných nádobách o objemu 0,25 l. Před vlastním stanovením proběhlo jejich šetrné rozmrazení. Poté byly vzorky filtrovány přes mikrofiltr do mikrozkušavek. V této fázi mohl být vzorek nastříknut do aparatury a následně stanoven (retenční čas pro diacetyl je 9,64 min).

6.5 Optimalizace metody a podmínky měření

Po několika prvních pokusných měřeních bylo z důvodů lepšího kvantitativního vyhodnocení přistoupeno k metodě standardního přídávku, kdy ke každému vzorku přefiltrovaného vína bylo přidáno stejné množství standardu diacetylu zředěného na koncentraci 1 mg/l (ředěno mobilní fází). Měřena tak byla tato směs 1:1. Každý vzorek byl proměřen čtyřikrát.

Lues a spol. jako mobilní fázi použili 0,009 – 0,0013 N kyselinu sírovou, ta by ale kvůli příliš nízkému pH mohla mít negativní vliv na konstrukci binárních pump. Proto byla jako mobilní fáze použita 1% kyselina ortofosforečná. V tabulce 5 jsou shrnuty optimalizované podmínky a nastavení metody.

Tab. 5. Podmínky měření

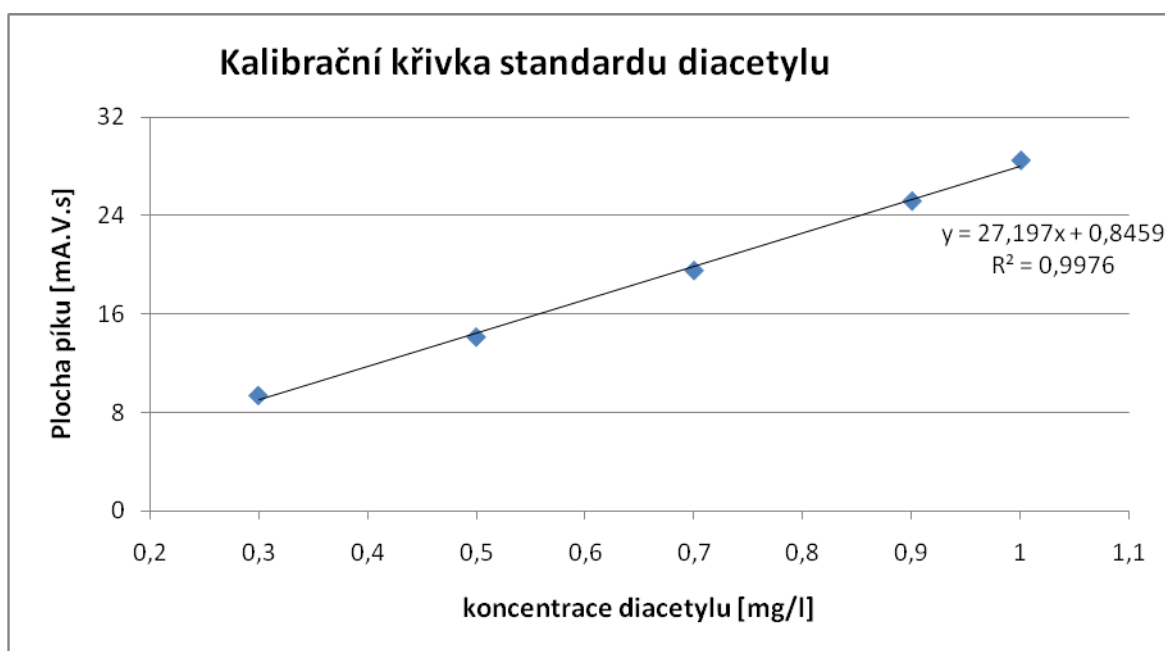
Typ kolony	Aminex HPX-87H Ion Exclusion Column 300 x 7,8 mm
Mobilní fáze	0,1% H ₃ PO ₄ (pH = 2,25)
Průtok	1,0 ml/min
Detektor	UV (DAD)
Měřená spektra	280, 290 nm
Nastavení termostatu	30 °C
Doba analýzy 1 vzorku	20 min.
Typ eluce	izokratická

Návratnost diacetylu byla sledována po přidavku jeho známého množství do studované matrice (červené hroznové víno). Bylo dosaženo návratnosti 96 – 102 % pro rozdílné koncentrace diacetylu. Reprodukovatelnost procedury byla zkoušena pomocí šesti analýz reprezentativních vzorků během 5 dnů.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Výsledek měření kalibrační křivky standardu diacetylu

Do chromatografu byly postupně nastříknuty standardy diacetylu zředěné mobilní fází na koncentrace 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 a 1,0 mg/l. Každá tato koncentrace byla proměřena šestkrát. Detekce proběhla při vlnových délkách 270, 280 a 290 nm. Nejlepší odezva detektoru byla při 280 nm, což znamená, že při této vlnové délce byla absorbance nejvyšší a plocha píku největší. Proto byly hodnoty ploch píků při vlnové délce 280 nm použity k sestrojení kalibrační křivky. Tabulka naměřených hodnot, podle kterých byla kalibrační křivka sestrojena, je uvedena v příloze P I.



Obr. 5. Graf kalibrační křivky standardu diacetylu; vlnová délka 280 nm

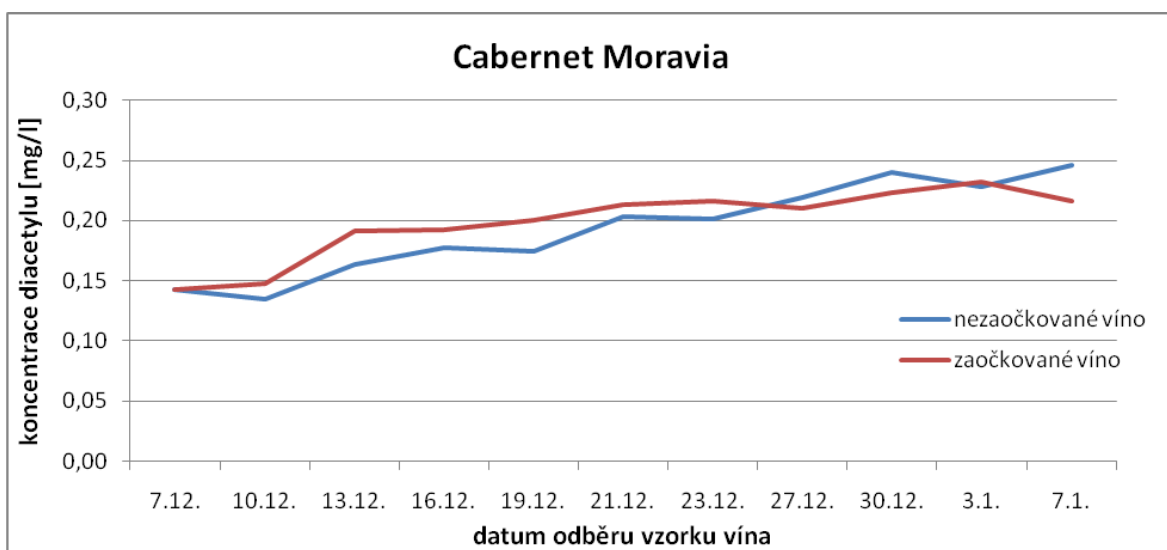
7.2 Výsledky měření vzorků vína

Reálné vzorky vína byly měřeny, rovněž jako koncentrační řada standardu diacetylu, za stanovených podmínek viz. Tab. 5. Tlak vyvíjený binárními pumpami v průběhu chromatografické analýzy byl ustálen na hodnotě 130 barů. Detekce probíhala již pouze ve dvou vlnových délkách 280 a 290 nm z toho důvodu, že při měření koncentrační řady stan-

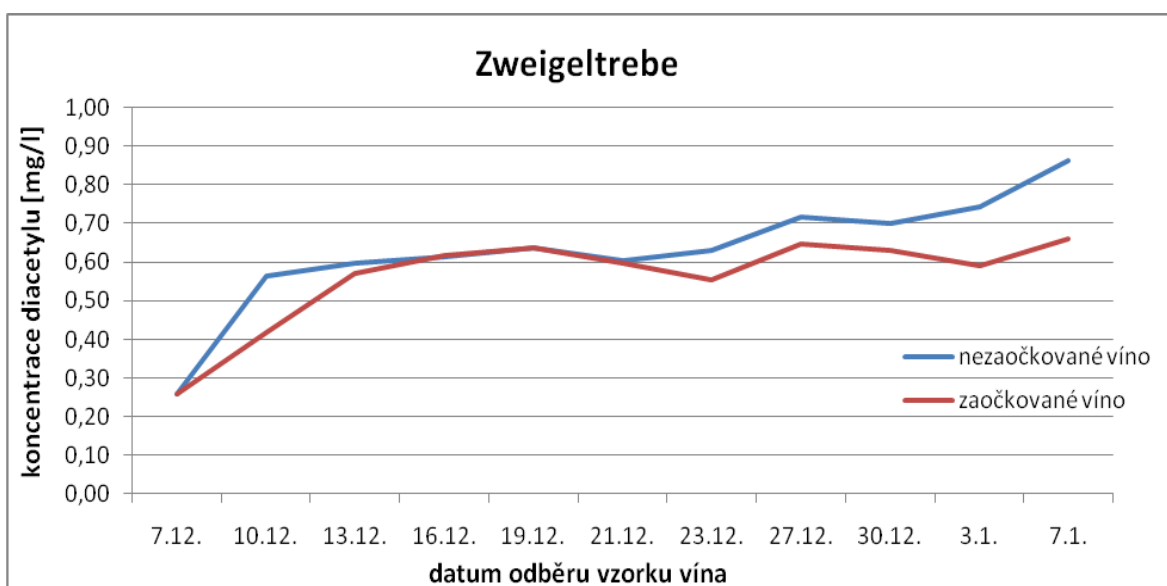
dardu diacetylu při 270 nm byla odezva detektoru nesrovnatelně slabší. Jako u měření koncentrační řady diacetylu byla i u reálných vzorků maximální odezva detektoru při 280 nm.

Zpracováním dat vzniklých chromatogramů byly získány hodnoty koncentrací diacetylu v průběhu JMK.

7.2.1 Vzorky od vinaře č. 1

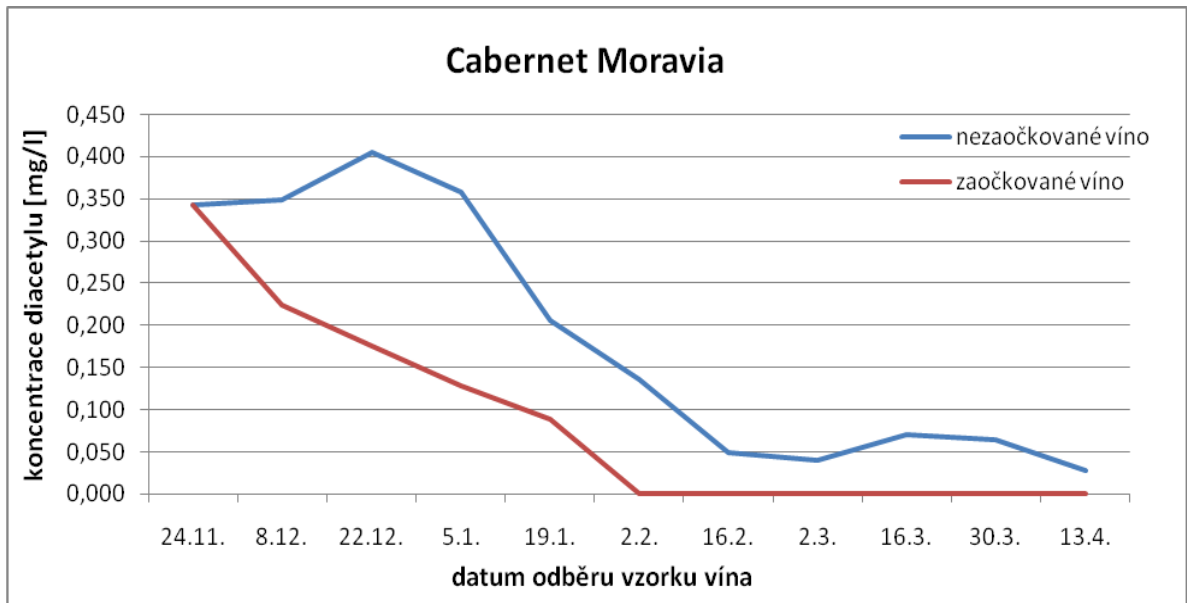


Obr. 6. Graf vývoje množství diacetylu v odrůdě Cabernet Moravia vinaře č. 1

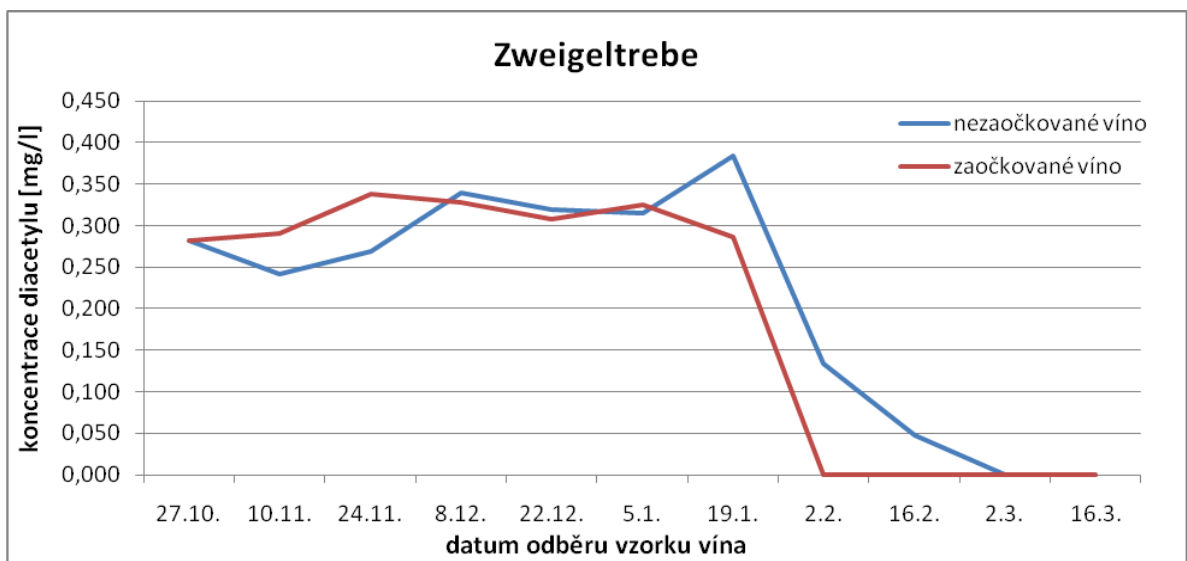


Obr. 7. Graf vývoje množství diacetylu v odrůdě Zweigeltrebe vinaře č. 1

7.2.2 Vzorčky od vinaře č. 2



Obr. 8. Graf vývoje množství diacetylu v odrůdě Cabernet Moravia vinaře č. 2



Obr. 9. Graf vývoje množství diacetylu v odrůdě Zweigeltrebe vinaře č. 2

Konkrétní data koncentrací diacetylu, na jejichž základě byly zkonstruovány tyto ná-
zorné grafy, jsou uvedeny v příloze P II.

7.3 Vlastní komentář výsledků a porovnání s dostupnou literaturou

Vzorky vína pocházející od vinaře č. 1, jak již bylo výše popsáno, byly odebírány v časovém horizontu jednoho měsíce, kdežto vzorky vína vinaře č. 2 v horizontu čtyř a půl měsíců. Lze tedy v prvním případě hovořit o krátkodobém pokusu, ve druhém pak o dlouhodobém pokusu.

U vína Cabernet Moravia od vinaře č. 1 je znát za celou dobu krátkodobého pokusu nárůst množství diacetylu, a to jak v zaočkovaných, tak i nezaočkovaných vzorcích, pouze s drobnými odchylkami. Nutno však podotknout, že koncentrace diacetylu se od prvního do posledního odběru liší v rozmezí pouze cca 0,1 mg/l. V prvních odebraných vzorcích byla zaznamenána vyšší koncentrace v zaočkovaných vzorcích než v nezaočkovaných vzorcích. Tento fakt značí počátek JMK a degradaci kyseliny citronové za vzniku diacetylu. Změna nastala 27.12., kdy pozorujeme vyšší koncentraci u nezaočkovaného vzorku. Zajímavé je srovnání posledních odběrů vzorků, které naznačuje tendenci k poklesu množství diacetylu v zaočkované matrici, naopak v nezaočkovaném víně její stálý mírný růst. Vysvětlením tohoto závěrečného poklesu koncentrace diacetylu u zaočkovaného vína může být přeměna diacetylu na další produkty metabolismu kyseliny citronové (acetoin a 2,3-butandiol.)

Vzrůstající trend koncentrace diacetylu byl rovněž zaznamenán u odrůdy vína Zweigeltrebe pocházejícího od vinaře č. 1. Zde je patrný nejvýraznější nárůst množství diacetylu v zaočkovaných i nezaočkovaných vzorcích do 19.12. Zajímavou skutečností je další zvýšení koncentrace diacetylu v nezaočkovaných vzorcích po 27.12. Od tohoto data se koncentrace diacetylu v zaočkovaných vzorcích mění už jen minimálně, ale narozdíl od odrůdy Cabernet Moravia zde není vidět tendence k poklesu jeho množství. Může to být dáno odrůdou, či důvodem by mohla být vyšší koncentrace kyseliny citronové v této odrůdě. Počáteční koncentrace diacetylu činí u odrůdy Zweigeltrebe 0,258 mg/l, kdežto u Cabernetu Moravia 0,143 mg/l. Zajímavé je, že u odrůdy Zweigeltrebe se oproti Cabernetu výrazněji zvýšila hodnota koncentrace diacetylu za dané období. Konečná koncentrace u Zweigeltrebe v zaočkovaném vzorku byla 0,662 mg/l a v nezaočkovaném dokonce 0,862 mg/l, kdežto u Cabernetu Moravia to bylo 0,246 mg/l, resp. 0,217 mg/l. Překvapivým zjištěním je vyšší koncentrace diacetylu u nezaočkovaných vzorků. Tu může způsobit například spontánní JMK vyvolané nekulturními bakteriemi.

Ještě zajímavější vývoj koncentrace diacetylu během JMK byl pozorován v dlouhodobém pokusu u vzorků pocházejících od vinaře č. 2. U odrůdy Cabernet Moravia se od zaočkování křivky koncentrací diacetylu rozcházejí. Zatímco u zaočkovaného vína již po čtrnácti dnech koncentrace diacetylu klesá, u nezaočkovaného vína má vzestupnou tendenci po dobu asi jednoho měsíce (do 22.12.), poté ovšem rovněž klesá. Klesající trend koncentrace diacetylu u zaočkovaného vína trvá až do 2.2., kdy již ve víně není detekován. Důsledkem bude předchozí odbourání veškeré kyseliny citronové a redukce diacetylu na další produkty metabolismu kyseliny citronové. Koncentrace diacetylu v nezaočkovaném víně rovněž klesla a dostala se na hodnotu 0,028 mg/l. Zajímavou skutečností je, že u zaočkovaného vzorku vína není znát žádný růst množství diacetylu ani v druhém odběru (8.12.), naopak jeho koncentrace již klesá. Důvodem může být větší rychlost JMK, kdy se z kyseliny citronové vytváří více kyseliny octové právě na úkor diacetylu, a také delší časový horizont čtrnácti dní, kdy tato skutečnost nemohla být zaznamenána.

U odrůdy Zweigeltrebe vinaře č. 2 dochází u zaočkovaného vína v prvních čtyřech týdnech k mírnému nárůstu množství diacetylu, avšak následujících šest týdnů se jeho hodnota tolik nemění. Teprve po těchto deseti týdnech, a nejvíce od dvanáctého týdne (19.1), dochází k prudkému úbytku diacetylu, kdy během následujících dvou týdnů už není ve víně detekován. Počáteční slabý nárůst a následující setrvání množství diacetylu na podobných hodnotách, a to v horizontu deseti týdnů, může značit velmi pomalý průběh JMK, či dokonce naznačovat neproběhnutí JMK. Vysvětlením by mohla být nižší, neoptimální teplota sklepa u vinaře č. 2. Diacetyl by i přes neproběhnutí JMK mohl být redukován kyselým prostředím na acetoin. Průběh vývoje koncentrace diacetylu v nezaočkovaném víně má kromě počátečního mírného poklesu a nárůstu 19.1. podobný trend jako v zaočkovaných vzorcích. Počáteční koncentrace diacetylu u odrůdy Cabernet Moravia byla 0,343 mg/l a u Zweigeltrebe 0,281 mg/l. Pokud porovnáme hodnoty počátečních koncentrací diacetylu z hlediska odrůd, u vinaře č. 1 byla vyšší u Zweigeltrebe, kdežto u vinaře č. 2 to bylo v odrůdě Cabernet Moravia.

Maximální naměřená koncentrace diacetylu byla u vína Zweigeltrebe vyprodukovaného vinařem č. 1., a sice u nezaočkovaného vína s hodnotou 0,862 mg/l, u zaočkovaného 0,662 mg/l. Martineau a kol. uvádí, že práh rozpoznání u červených vín leží v rozmezí 0,9 – 2,8 mg/l (u odrůd Rulandské modré a Cabernet Sauvignon). [57] Lze tedy předpokládat, že by diacetyl toto víno po organoleptické stránce nepoznamenal.

Co se týče obsahu diacetylu ve víně, zajímavý výzkum prováděl Bartowsky a spol. (2002). Ve své práci se zabývali stanovením diacetylu v různých odrůdách bílých, ale i červených vín. Celkem analyzovali 43 červených vín, konkrétně 18 odrůd Cabernet Sauvignon, 4 odrůdy Merlot, a 21 odrůd Shiraz. Průměrný obsah diacetylu byl u Cabernetu Sauvignon 0,7 mg/l, u Merlotu 0,4 mg/l a u Shirazu 1,2 mg/l. Jednalo se o běžně zakoupená vína. [17] Srovnáním těchto hodnot s hodnotami krátkodobého pokusu, kde byly konečné koncentrace diacetylu u zaočkovaného, resp. nezaočkovaného Cabernetu Moravia 0,217, resp. 0,246 mg/l a u Zweigeltrebe 0,662 a 0,862 mg/l, je patrné, že vzorek vína Zweigeltrebe je v rozmezí hodnot naměřených Bartowskym a spol. nejbližší odrůdě Cabernet Sauvignon a Cabernet Moravia lehce pod hodnotou Merlotu. To vše za předpokladu, že by bylo JMK ukončeno a koncentrace diacetylu by se již neměnily.

Veškerá dostupná literatura, z níž bylo čerpáno, uvádí, že při JMK vlivem odbourávání kyseliny citronové dochází k tvorbě diacetylu, tudíž se jeho koncentrace ve víně zvyšuje. Výsledky vzorků od vinaře č. 1 toto potvrzují, avšak u vína od vinaře č. 2 k tomuto jevu nedochází, pravděpodobně v důsledku neoptimální teploty sklepa.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo zjistit závislost obsahu diacetylu ve vybraných vzorcích vína na průběhu jablečno-mléčného kvašení. V teoretické části byla popsána technologie výroby červeného vína, včetně procesu jablečno-mléčného kvašení, vysvětlen vznik diacetylu jako parametru jakosti vína a charakterizovány metody jeho stanovení.

Pro vlastní stanovení obsahu diacetylu byla vybrána metoda iontově-výměnné HPLC, použita byla aparatura Hewlett Packard series 1100 s UV/VIS DAD detektorem. K analýze byly poskytnuty vzorky červeného révového vína odrůd Cabernet Moravia a Zweigeltrebe pocházející od dvou různých vinařů ze stejné vinařské obce Polešovice. Po proběhnutí hlavního alkoholového kvašení byla část vína zaočkována komerční kulturou bakterií BIOSTART® FORTE SK2 (kmen *Oenococcus oeni*) pro nastartování biologického odbourávání kyselin. V průběhu tohoto jablečno-mléčného kvašení byly postupně odebírány vzorky každé odrůdy, vždy jeden zaočkovaný a jeden nezočkovaný. Po úpravě vzorků a měření dle popsané metodiky byly získány žádané závislosti obsahu diacetylu na průběhu jablečno-mléčného kvašení.

U vinných odrůd pocházejících od vinaře č. 1 je znát poměrně stabilní mírný růst diacetylu v celém sledovaném průběhu jablečno-mléčného kvašení (časový horizont jednoho měsíce). Diacetyl je totiž vytvářen jako meziprodukt metabolismu kyseliny citronové, k jejímuž odbourávání vlivem mléčných bakterií dochází. Nárůst koncentrace diacetylu oproti počáteční koncentraci byl u zaočkovaných vzorků v případě Cabernetu Moravia 0,074 mg/l, a to na konečnou koncentraci 0,217 mg/l, a v případě Zweigeltrebe 404 mg/l na 0,662 mg/l. Zajímavou skutečností je, že konečné koncentrace u nezočkovaných vzorků byly lehce vyšší než u zaočkovaných (0,246 mg/l u Cabernetu Moravia a dokonce 0,862 mg/l u Zweigeltrebe). Důvodem by mohlo být neřízené jablečno-mléčné kvašení vyvolané nekulturními bakteriemi.

Vzorky pocházející od vinaře č. 2 byly odebírány v delším časovém období (časový horizont čtyři a půl měsíce) a intervalu čtrnácti dní. U odrůdy Cabernet Moravia dochází u zaočkovaných vzorků k okamžitému poklesu množství diacetylu, kdy po deseti týdnech již není ve víně detekován. Důvodem může být příliš vysoká rychlost jablečno-mléčného kvašení, kdy je produkce diacetylu potlačena na úkor vznikající kyseliny octové. Dalším vysvětlením by mohl být dlouhý interval odběru, kdy by přeci jen k nárůstu diacetylu došlo,

avšak dříve než po čtrnácti dnech, a byl tak zaznamenán pouze až jeho pokles z důvodu jeho redukce na acetoin a 2,3 butandiol. U odrůdy Zweigeltrebe se po počátečním mírném nárůstu koncentrace diacetylu v horizontu následujících šesti týdnů téměř nemění a teprve potom začne klesat, až není detekován. Tento průběh může značit velmi pomalý průběh JMK, či dokonce naznačovat neproběhnutí jablečno-mléčného kvašení. Důvodem by mohla být nižší, neoptimální teplota sklepa u vinaře č. 2., než která je za potřebí pro rozvoj bakterií *Oenococcus oeni*.

Komerční kultura bakterií *Oenococcus oeni* BIOSTART® FORTE SK2 se alespoň dle výsledků analýzy vín produkovaných vinařem č. 1 jeví jako velmi vhodná. Nedochází totiž k přílišnému nárůstu koncentrace diacetylu, tak aby negativně ovlivnil organoleptické vlastnosti vína. Tato přednost bakterií *Oenococcus oeni* se potvrdila. V naší analýze byla maximální hodnota koncentrace diacetylu u zaočkovaného vína Zweigeltrebe pocházejícího od vinaře č. 1 rovna hodnotě 0,662 mg/l, což znamená, že leží dokonce pod prahem rozpoznatelnosti diacetylu ve víně.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KADLEC, P. a kolektiv. *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
- [2] STEIDL, R. *Sklepní hospodářství*. 1. vyd. Valtice: Národní salon vín, 2002. 307 s. ISBN 80-903201-0-4.
- [3] PAVLOUŠEK, P. *Výroba vína u malovinařů*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2006. 100 s. ISBN 80-247-1247-4.
- [4] ČEPIČKA, J. a kolektiv. *Obecná potravinářská technologie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995, 246 s. ISBN 8070802391.
- [5] ROP, O., HRABĚ, J. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009. 129 s. ISBN 978-80-7318-748-4.
- [6] KRAUS, V., HUBÁČEK, V., ACKERMANN, P. *Rukověť vinaře*. 1. vyd. Praha: Květ: Brázda, 2000. 262 s. ISBN 80-85362-34-1 (Květ), 80-209-0286-4 (Brázda).
- [7] PÁTEK, J. *Zrození vína: všechno o pěstování, zpracování a konzumaci vína*. 1. vyd. Brno: Books, 1998. 248 s. ISBN 80-7242-039-9.
- [8] HERJAVEC, S., TUPAJIC, P., MAJDAK, A. Influence of Malolactic Fermentation on the Quality of Riesling wine. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 2001, 66 (1), pp. 59 – 64.
- [9] MORENO-ARRIBAS, M., POLO, M. *Wine chemistry and biochemistry*. New York: Springer, 2009. 735 pp. ISBN 978-0-387-74118-5.
- [10] BARTOWSKY, E. J., HENSCHKE, P. A. The ‘buttery’ attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 96, pp. 235 – 252.
- [11] LONVAUD-FUNEL, A. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1999, 76, pp. 317 – 331.
- [12] JACKSON, Ron S. *Wine science: principles, practice, perception*. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2000. 645 pp. ISBN 0-12-379062-X.
- [13] GARVIE, Ellen I. *Leuconostoc oenos* sp. nov. *Journal of General Microbiology*, 1967, 48, pp. 431 – 438.

- [14] DICKS, L. M. T., DELLAGLIO, F., COLLINS, M. D. Proposal to Reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, pp. 395 – 397.
- [15] *Malolactic fermentation* [online]. [cit. 2011-07-21]. Dostupné z WWW:
<http://www.winenet.com.au/modules/mastop_publish/files/files_4c45422fdd1fa.pdf>
- [16] UGLIANO, M., MOIO, L. Changes in the Concentration of Yeast/Derived Volatile Compounds of Red Wine during Malolactic Fermentation with Four Commercial Starter Cultures of *Oenococcus oeni*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2005, 53, pp. 10134 – 10139.
- [17] BARTOWSKY, E. J., FRANCIS, I. L., BELLON, J. R., HENSCHKE, P. A. Is buttery aroma perception in wine predictable from diacetyl concentration? *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2002, 8, pp. 180 – 185.
- [18] NIELSEN, J. C., RICHELIEU, M. Control of Flavor Development in Wine during and after Malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*, Feb. 1999, pp. 740 – 745.
- [19] VEČEŘA, M., BORECKÝ, J., CHURÁČEK, J., GASPARIČ, J. *Chemické tabulky organických sloučenin*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1975. 887 s.
- [20] *Diacetyl, máslo a popcorn* [online]. [cit. 2011-07-24]. Dostupné z WWW:
<<http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=332>>
- [21] LUKEŠ, R. a kolektiv. *Organická chemie II*. 1. Vyd. Praha: Československá akademie věd, 1962. 814 s.
- [22] RODRIGUES, P. G., RODRIGUES, J. A., BARROS, A. A., LAPA, R. A. S., LIMA, J. L. F. C., MACHADO CRUZ, J. M., FERREIRA, A. A. Automatic Flow System with Voltametric Detection for Diacetyl Monitoring during Brewing Process. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2002, 50, pp. 3647 – 3653.
- [23] *Hazard communication guidance for diacetyl and food flavorings containing diacetyl*, United States department of labor, Occupation, safety and health administration [online]. [cit. 2011-07-25]. Dostupné z WWW:
<<http://www.osha.gov/dsg/guidance/diacetyl-guidance.html>>

- [24] *Diacetyl: Formation, Reduction, and Control, Brewing Techniques* [online]. [cit. 2011-07-25]. Dostupné z WWW:
<<http://www.brewingtechniques.com/library/backissues/issue1.2/fix.html>>
- [25] *Diacetyl, Sugar Illovo group* [online]. [cit. 2011-07-25]. Dostupné z WWW:
<http://www.illovo.co.za/Libraries/Diacetyl/Diacetyl_Safety_Data_Sheet.sflb.ashx>
- [26] *Diacetyl, Chemspider, The free chemical database* [online]. [cit. 2011-07-25]. Dostupné z WWW:
<<http://motd.chemspider.com/Chemical-Structure.630.html>>
- [27] *Diacetyl* [online]. [cit. 2011-07-25]. Dostupné z WWW:
<<https://sites.google.com/site/gatesdiacetyl/physical-properties>>
- [28] *2,3 – butadione, International Chemical Safety Card* [online]. [cit. 2011-07-25]. Dostupné z WWW:
<<http://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng1168.html>>
- [29] MARTINEAU, B., ACREE, T., HENICK-KLING, T. A simple and accurate GC/MS method for the quantitative analysis of diacetyl in beer and wine. *Biotechnology techniques*, 1994, 8 (1), pp. 7 – 12.
- [30] RAMOS, A., LOLKEMA, J. S., KONINGS, W. N., SANTOS, H. Enzyme Basis for pH Regulation of Citrate and Pyruvate Metabolism by *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*, Apr. 1995, pp. 1303 – 1310.
- [31] *Wine Blogging Wednesday 68: Got Gamay?* [online]. [cit. 2011-07-27]. Dostupné z WWW:
<<http://ithacork.com/2010/04/22/wine-blogging-wednesday-68-got-gamay/>>
- [32] *A case of regulatory failure – Popcorn Worker Lung, The Project on Scientific Knowledge and Public Policy (SKAPP)* [online]. [cit. 2011-07-28]. Dostupné z WWW:
<http://www.defendingscience.org/case_studies/A-Case-of-Regulatory-Failure-Popcorn-Workers-Lung.cfm>
- [33] *Diacetyl, Toxipedia* [online]. [cit. 2011-07-28]. Dostupné z WWW:

- <<http://toxipedia.org/display/toxipedia/Diacetyl>>
- [34] *Bronchiolitis acuta* [online]. [cit. 2011-07-28]. Dostupné z WWW:
<<http://www.cls.cz/dokumenty2/postupy/t170.rtf>>
- [35] *Popcorn Flavor Ingredient May cause Lung Disease in Consumers, Natural News* [online]. [cit. 2011-07-28]. Dostupné z WWW:
<http://www.naturalnews.com/024460_popcorn_disease_diacetyl.html>
- [36] *What is Popcorn Lung? Wise Geek* [online]. [cit. 2011-07-29]. Dostupné z WWW:
<<http://www.wisegeek.com/what-is-popcorn-lung.htm>>
- [37] *Kolorimetrie, Velký lékařský slovník* [online]. [cit. 2011-07-29]. Dostupné z WWW:
<<http://lekarske.slovniky.cz/pojem/kolorimetrie>>
- [38] OPAVA, Z. *Chemie kolem nás*. 1. vyd. Praha: Albatros, 1986. 318 s.
- [39] POPL, M. *Základy instrumentální analýzy*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze a Pardubicích, 1978. 223 s.
- [40] RODRIGUES, J. A., BARROS, A. A., RODRIGUES, P. G. Differential Pulse Polarographic Determination of *r*-Dicarbonyl Compounds in Foodstuffs after Derivatization with *o*-Phenylenediamine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1999, 47, pp. 3219 – 3222.
- [41] *Látky vonné a chuťové* [online]. [cit. 2011-07-29]. Dostupné z WWW:
<<http://web.vscht.cz/koplikr/L%C3%A1tky%20vonn%C3%A9%20a%20chu%C5%A5ov%C3%A9.pdf>>
- [42] PURETSKII, N. A., PROSKURNIN, M. A., PIROGOV, A. V. Determination of Diacetyl with Spectrophotometry and Thermal-Lens Spectrometry. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 2009, 64 (2), pp. 93 – 98.
- [43] GARCÍA-VILLANOVA, R. J., GARCÍA ESTEPA, R. M. Fluorimetric determination of diacetyl and 2,3-pentadione with isoniazide and a zirconium salt. *Talanta*, 1993, 40 (9), pp. 1419 – 1423.
- [44] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. uprav. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s.

- [45] BEREK, D., KARDOŠ, E. *Základy kapalinové chromatografie*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1979, 296 s.
- [46] *Chromatografie* [online]. [cit. 2011-07-31]. Dostupné z WWW:
<http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc>
- [47] *Pár slov o HPLC, lach:ner* [online]. [cit. 2011-08-01]. Dostupné z WWW:
<<http://www.lach-ner.com/par-slov-o-hplc/t-296/?n=10>>
- [48] POPL, M. KUBÁT, J. *Separace látek*. 3. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1986, 172 s.
- [49] *How Does High Performance Liquid Chromatography Work? Waters, The Science of What's Possible* [online]. [cit. 2011-08-01]. Dostupné z WWW:
<http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049055&locale=en_US>
- [50] *Hplc.cz* [online]. [cit. 2011-08-02]. Dostupné z WWW:
<<http://www.hplc.cz/>>
- [51] LANDAUD, S., LIEBEN, P., PICQUE, D. Quantitative Analyses of Diacetyl, Pentadione and their Precursors During Beer Fermentation by an Accurate GC/MS Method. *The Journal of The Institute of Brewing*, 1998, 104, pp. 93 – 99.
- [52] PEJIN, J. D., GRUJIČ, O. S., MARJANOVIČ, N. J., VUJIČ, D. N., KOCIČ-TANACKOV, S. D. Determination of Diacetyl and 2,3-pentadione in Beer by GC/MS Using Solid-Phase Extraction Columns. *APTEFF*, 2002, 33, pp. 45 – 54.
- [53] HAYASAKA, Y. BARTOWSKY, E. J. Analysis of Diacetyl in Wine Using Solid-Phase Microextraction Combined with Gas Chromatography - Mass Spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1999, 47 pp. 612 – 617.
- [54] Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analytů, *Chemické listy* [cit. 2011-08-03]. Dostupné z WWW:
<<http://chemicke-listy.cz/Bulletin/bulletin334/bulletin334.pdf>>
- [55] LUES, R. F. J., BOTHA C. W., SMIT, J. E. Ion-exchange HPLC of Cheese-related Organic Acids in Comparison with Reverse-phase HPLC, *Elsevier - International Dairy Journal*, 1998, 8 (12), p. 959-965.

[56] *BioStart Forte SK2* [online]. [cit. 2011-08-08]. Dostupné z WWW:

<<http://www.vinarskyraj.cz/detail/biostart-forte-sk2-0-040-kg-na-1000-l/>>

[57] MARTINEAU, B., ACREE, T. E., HENICK-KLING, T. Effect of wine type on detection threshold for diacetyl. *Food Research International*, 1995, 28 (2), pp. 139 – 143.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HPLC High Performance Liquid Chromatography

PVPP polyvinylpolypyrrolidon

JMK jablečno-mléčné kvašení

FDA Food and Drug Administration

PEEK polyetereterketon

SPME Solid Phase Microextraction

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Rovnice malolaktického kvašení

Obr. 2. Diacetyl – strukturní vzorec

Obr. 3. Metabolismus kyseliny citronové (víno, *Oenococcus oeni*)

Obr. 4. Schéma kapalinového chromatografu

Obr. 5. Graf kalibrační křivky standardu diacetylu; vlnová délka 280 nm

Obr. 6. Graf vývoje množství diacetylu v odrůdě Cabernet Moravia vinaře č. 1

Obr. 7. Graf vývoje množství diacetylu v odrůdě Zweigeltrebe vinaře č. 1

Obr. 8. Graf vývoje množství diacetylu v odrůdě Cabernet Moravia vinaře č. 2

Obr. 9. Graf vývoje množství diacetylu v odrůdě Zweigeltrebe vinaře č. 2

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Sířící dávky

Tab. 2. Závislost kvality odkalování na čase při diskontinuálním způsobu

Tab. 3. Vliv teploty na délku kvašení

Tab. 4. Vlastnosti diacetylu

Tab. 5. Podmínky měření

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku standardu diacetylu

PŘÍLOHA P II Výsledky koncentrací diacetylu

**PŘÍLOHA P I: NAMĚŘENÉ HODNOTY PRO KALIBRAČNÍ KŘIVKU
STANDARDU DIACETYLU**

Koncentrace diacetylu [mg/l]	0,3	0,5	0,7	0,9	1
Plocha píku [mA.V.s]	9,8	14,3	19,6	25,3	28,6
	9,7	14,3	19,6	25,4	28,6
	9,3	14,1	19,6	25,2	28,3
	9,4	14,1	19,6	25,2	28,3
	9,1	14,0	19,4	25,0	28,4
	9,1	14,0	19,4	25,0	28,6
Průměrná plocha píku [mA.V.s]	9,40	14,13	19,53	25,17	28,47
Směrodatná odchylka	0,271	0,125	0,094	0,146	0,137

PŘÍLOHA P II: VÝSLEDKY KONCENTRACÍ DIACETYLU

Cabernet Moravia (vinař č. 1)				
	Zaočkované víno		Nezaočkované víno	
Datum odběru	Koncentrace diacetylu [mg/l]	Směrodatná odchylka	Koncentrace diacetylu [mg/l]	Směrodatná odchylka
7.12.	0,143	0,0129	0,143	0,0129
10.12.	0,148	0,0090	0,135	0,0246
13.12.	0,192	0,0742	0,163	0,0261
16.12.	0,193	0,0285	0,177	0,0196
19.12.	0,200	0,0313	0,174	0,0183
21.12.	0,213	0,0155	0,204	0,0311
23.12.	0,217	0,0259	0,201	0,0012
27.12.	0,210	0,0040	0,219	0,0233
30.12.	0,223	0,0220	0,240	0,0012
3.1.	0,232	0,0248	0,228	0,0285
7.1.	0,217	0,0025	0,246	0,0272

Zweigeltrebe (vinař č. 1)				
	Zaočkované víno		Nezaočkované víno	
Datum odběru	Koncentrace diacetylu [mg/l]	Směrodatná odchylka	Koncentrace diacetylu [mg/l]	Směrodatná odchylka
7.12.	0,258	0,0025	0,258	0,0025
10.12.	0,418	0,0168	0,562	0,0129
13.12.	0,572	0,0586	0,596	0,0220
16.12.	0,616	0,0066	0,614	0,0027
19.12.	0,638	0,0090	0,637	0,0168
21.12.	0,596	0,0103	0,605	0,0259
23.12.	0,554	0,0209	0,630	0,0220
27.12.	0,646	0,0207	0,716	0,0051
30.12.	0,630	0,0651	0,701	0,0276
3.1.	0,590	0,0079	0,745	0,0040
7.1.	0,662	0,0599	0,862	0,0118

Cabernet Moravia (vinař č. 2)				
	Zaočkované víno		Nezaočkované víno	
Datum odběru	Koncentrace diacetylu [mg/l]	Směrodatná odchylka	Koncentrace diacetylu [mg/l]	Směrodatná odchylka
24.11.	0,343	0,0302	0,343	0,0302
8.12.	0,224	0,0292	0,349	0,0268
22.12.	0,175	0,0301	0,406	0,0274
5.1.	0,128	0,0305	0,358	0,0265
19.1.	0,088	0,0000	0,206	0,0293
2.2.	0,000	0,0000	0,135	0,0300
16.2.	0,000	0,0000	0,049	0,0309
2.3.	0,000	0,0000	0,040	0,0309
16.3.	0,000	0,0000	0,070	0,0308
30.3.	0,000	0,0000	0,064	0,0303
13.4.	0,000	0,0000	0,028	0,0306

Zweigeltrebe (vinař č. 2)				
	Zaočkované víno		Nezaočkované víno	
Datum odběru	Koncentrace diacetylu [mg/l]	Směrodatná odchylka	Koncentrace diacetylu [mg/l]	Směrodatná odchylka
27.10.	0,281	0,0301	0,281	0,0301
10.11.	0,291	0,0293	0,242	0,0287
24.11.	0,338	0,0284	0,269	0,0265
8.12.	0,327	0,0277	0,339	0,0302
22.12.	0,307	0,0280	0,319	0,0279
5.1.	0,325	0,0297	0,315	0,0303
19.1.	0,286	0,0296	0,383	0,0267
2.2.	0,000	0,0000	0,134	0,0291
16.2.	0,000	0,0000	0,048	0,0305
2.3.	0,000	0,0000	0,000	0,0000
16.3.	0,000	0,0000	0,000	0,0000