

Stanovení hlavních dikarboxylových sloučenin vína

Bc. Romana Turečková

Diplomová práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Romana TUREČKOVÁ**
Osobní číslo: **T10533**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Stanovení hlavních dikarbonylových sloučenin vína**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Popište chemické složení vína
2. Charakterizujte dikarbonylové sloučeniny a jejich přítomnost v révovém vínu
3. Vypracujte literární rešerši stanovení dikarbonylových sloučenin u vína

II. Praktická část

1. Optimalizujte vybranou analytickou metodu pro stanovení dikarbonylových sloučenin ve víně
2. Analyzujte vybrané vzorky vína a naměřená data porovnejte s literaturou

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. JACKSON, R. S. **Wine science: principles, practice, perception**. Vyd. 2. London: Academic, 2000. ISBN 978-0-12-379062-0.
2. DAGLIA M., A. PAPETTI, P. GRISOLI, C. ACETI, V. SPINI, C. DACERRO a G. GAZZANNI. **Isolation, Identification, and Quantification of Roasted Coffee Antibacterial Compounds**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Washington: American Chemical Society, 2007, 55(25), 10208-10213. ISSN: 0021-8561
3. DE REVEL G., L. PRIPIS-NICOLAU, J. C. BARBE a A. BERTRAND. **The detection of alpha-dicarbonyl compounds in wine by formation of quinoxaline derivatives**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Malden: Willey-Blacwell, 2000, 80(1), 102-108. ISSN: 0022-5142
4. DA SILVA FERREIRA A. C., S. RESIS, C. RODRIGUES, C. OLIVEIRA a P. G. DE PINHO. **Simultaneous determination of ketoacids and dicarbonyl compounds, Key Maillard intermediates on the generation of aged wine aroma**. *Journal of Food Science*. Oxford: Blackwell Publishing, 2007, 72(5), S314-S318. ISSN: 0022-1147

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Pavel Hanuštiak

Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

11. února 2013

Termín odevzdání diplomové práce:

17. května 2013

Ve Zlíně dne 11. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
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 Ve Zlíně

.....

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

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

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

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

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

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či 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). Odpirá-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 výtěžku 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 výtěžku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Předmětem diplomové práce bylo stanovení diacetylu, methylglyoxalu, glyoxalu a pentandionu ve vzorcích vín pomocí kapalinové chromatografie HPLC. Teoretická část práce se zabývá chemickým složením vína, významem výše zmíněných dikarbonylových sloučenin a jednotlivých metod pro jejich stanovení. V praktické části je uvedena metodika stanovení dikarbonylových sloučenin ve vzorcích vín za využití chromatografické metody HPLC.

Klíčová slova: víno, diacetyl, methylglyoxal, glyoxal, pentan-2,3-dion, HPLC.

ABSTRACT

The main object of diploma thesis was to determine of diacetyl, methylglyoxal, glyoxal and pentanedione in samples of wines by liquid chromatography HPLC. The theoretical part deals with the chemical composition of the wine, the importance of the aforementioned dicarbonyl compounds and various methods for their determination. The experimental part describes the methodology for the determination of dicarbonyl compounds in wine samples using chromatographic method HPLC.

Keywords: wine, diacetyl, glyoxal, methylglyoxal, pentane-2,3-dione, HPLC.

Poděkování

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

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 CHEMICKÉ SLOŽENÍ VÍNA	12
1.1 VODA	12
1.2 ALKOHOLY.....	12
1.2.1 Etanol	12
1.2.2 Metanol	13
1.2.3 Vyšší alkoholy.....	13
1.2.4 Dioly, polyalkoholy a cukerné alkoholy	13
1.3 SACHARIDY	14
1.3.1 Pektiny, gumy, polysacharidy	15
1.4 KYSELINY	15
1.4.1 Kyselina vinná.....	15
1.4.2 Kyselina jablečná	16
1.4.3 Kyseliny mléčná.....	16
1.4.4 Kyselina octová	16
1.4.5 Kyselina citronová	17
1.4.6 Kyselina jantarová.....	17
1.5 MINERÁLNÍ LÁTKY	18
1.6 DUSÍKATÉ SLOUČENINY	18
1.6.1 Aminy.....	18
1.6.2 Amidy.....	19
1.6.3 Aminokyseliny	19
1.7 PROTEINY	19
1.8 ALDEHYDY A KETONY	20
1.8.1 Aldehydy	20
1.8.2 Ketony	20
1.9 ESTERY	21
1.10 FENOLICKÉ LÁTKY VE VÍNĚ	21
1.10.1 Flavonoidy.....	22
1.10.1.1 Flavonoly.....	22
1.10.1.2 Antokyany	22
1.10.1.3 Trísloviny	22
1.10.1.4 Ostatní flavonoidy.....	23
1.10.2 Ne-flavonoidy	23
1.11 LIPIDY	24
1.12 VITAMÍNY	24
2 DIKARBONYLOVÉ SLOUČENINY	26
2.1 KARBONYLOVÉ SLOUČENINY	26
2.1.1 Ketony	26
2.1.2 Aldehydy	27
2.2 HLAVNÍ DIKARBONYLOVÉ SLOUČENINY	27
2.2.1 Diacetyl a pentan-2,3-dion	28

2.2.2	Glyoxal.....	29
2.2.3	Methylglyoxal	29
3	STANOVENÍ DIKARBONYLOVÝCH SLOUČENIN U VÍNA.....	31
3.1	KOLORIMETRICKÁ METODA	31
3.2	GRAVIMETRICKÁ METODA	31
3.3	SPEKTROFOTOMETRIE	31
3.4	KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE	31
3.4.1	Kapalinový chromatograf.....	32
3.4.2	Stanovení obsahu dikarbonylových sloučenin pomocí kapalinové chromatografie	33
3.5	PLYNOVÁ CHROMATOGRFIE.....	34
3.5.1	Stanovení obsahu dikarbonylových sloučenin pomocí plynové chromatografie	36
II	PRAKTICKÁ ČÁST.....	37
4	CÍL PRÁCE	38
5	MATERIÁL A METODIKA PRÁCE.....	39
5.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	39
5.2	PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	39
5.3	ANALYZOVANÝ MATERIÁL.....	39
5.3.1	Úprava vzorků před stanovením	40
5.4	METODIKA	40
5.4.1	Postup pro stanovení jednotlivých dikarbonylových sloučenin ve víně	40
6	VÝSLEDKY A DISKUSE	42
	ZÁVĚR	47
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	48
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	53
	SEZNAM OBRÁZKŮ	54
	SEZNAM TABULEK.....	55
	SEZNAM PŘÍLOH.....	56

ÚVOD

Víno je jedním z nejdéle známých alkoholických nápojů. Historie vína se vyvíjela od obyvatel Mezopotámie a starého Egypta, přes antiku Řecka a Říma, středověk Evropy až k dnešním dnům. Pěstování vinné révy na našem území je známo asi 2000 let. V naší zemi jsou využívány moderní technologie, je zde dobrá technologická základna a vinařství se prezentuje výbornými víny vysoké kvality.

Podle Českého statistického úřadu se spotřeba vína v posledních letech razantně zvyšuje. Uvádí, že v roce 1948 obyvatel tehdejšího Československa vypil v průměru necelých 5 litrů hroznového vína ročně. Na začátku 90. let minulého století byla spotřeba přibližně dvojnásobná, cca 11 litrů na osobu. V letech 2005-2008 se počet litrů na osobu zvyšoval postupně z 15 na 18 litrů, v roce 2009 se pohyboval pod hranicí 19 litrů na osobu. V současnosti je hranice okolo 20 litrů na osobu.

I když révové víno nepatří mezi základní potraviny, obsahuje i látky nezbytné pro výživu člověka, jako sacharidy, bílkoviny, vitamíny a minerální látky. Vedle těchto látek jsou ve víně zkoumány i takové látky, které významně ovlivňují jeho chuť a vůni. Příkladem takových látek jsou popsány v práci dikarboxylové sloučeniny, zejména diacetyl, methylglyoxal, glyoxal a pentandion.

V 60. letech 20. století se začaly vyvíjet moderní analytické separační metody, jejichž pomocí lze např. zjistit látkové složení vína. Mezi tyto metody patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) umožňující analyzovat více látek najednou. Oproti klasickým laboratorním metodám má HPLC mnoho předností, jako rychlost a přesnost dané analýzy a také téměř úplná automatická.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHEMICKÉ SLOŽENÍ VÍNA

Vínem se rozumí výrobek, který byl získán výhradně úplným nebo částečným alkoholovým kvašením čerstvých, rozdrcených nebo nerozdrcených vinných hroznů nebo hroznového moštu [1]. Po biochemické stránce je to mimořádně složitý produkt [2, 3].

Zdravé a kvalitní hrozny, jsou základem pro výrobu kvalitního vína. Mezi hlavní složky vína patří voda, etanol, glycerol, cukry a organické kyseliny. Mezi stopové složky patří minerální látky, dusíkaté látky, ostatní alkoholy, estery, karbonylové sloučeniny, proteiny, lipidy, fenolické látky a vitamíny [2]. Při posuzování kvality vína se uplatní nejprve vjemy zrakové a čichové, ale rozhodující je jeho chuť [4].

1.1 Voda

Voda je hlavní chemickou složkou hroznů a vína, má významnou roli při stanovení základních charakteristik vína. Je esenciální složkou pro mnoho chemických reakcí spojených s růstem hroznů, fermentací šťávy a zrání vína [5]. Její množství závisí na odrůdě, stupni vyzrání a na klimatických podmínkách [6, 7]. Veškerá voda je biologického původu, prošla kořenovým a cévním systémem rostliny, žádná voda se již do vína nepřidává [8, 9].

1.2 Alkoholy

Alkoholy jsou organické sloučeniny, které obsahují jednu nebo více hydroxylových skupin (-OH) [5].

1.2.1 Etanol

Nejdůležitějším alkoholem ve víně je etanol, kde je jeho hlavním zdrojem fermentace. Vzniká enzymatickým rozkladem glukózy a fruktózy [8]. Během fermentace může být množství etanolu maximálně 15%, jelikož při vyšší koncentraci nemohou kvasinky působit [5, 6].

Etanol je důležitý pro stabilitu, zrání a sensorické vlastnosti vína. Inhibiční účinek etanolu v kombinaci s kyselostí vína umožňuje vínu zůstat stabilní bez přítomnosti vzduchu několik let. Etanol má význam jako rozpouštědlo při extrakci barviv a tríslovin během fermentace. Ovlivňuje množství produkovaných aromatických látek ve víně [5]. Pomalu reaguje s organickými kyselinami za vzniku esterů a i s aldehydy za vzniku acetalů [3, 5].

1.2.2 Metanol

Metanol nepatří mezi hlavní složky vína, ale má zásadní význam pro vývoj a tvorbu aroma. Obvykle se vyskytuje v množství 0,01 – 0,2 g/l. Metanol je sám o sobě vysoce jedovatý alkohol a jeho oxidací vzniká formaldehyd a kyselina mravenčí, které jsou ještě daleko víc toxičtější [2, 3, 5]. Omezené množství metanolu je ve víně hlavně při enzymatickém odbourávání pektinů, kdy jsou metylové skupiny pektinů uvolňovány jako metanol [5].

1.2.3 Vyšší alkoholy

Většina vyšších alkoholů má štiplavou vůni. Koncentrace vyšších alkoholů ve víně je okolo 0,3 g/l [5, 11]. I když jsou ve víně zastoupeny v relativně malém množství, mají na základě výrazného vlivu na vůni a chuť důležitou roli pro aroma vína. Vyšší alkoholy jsou často nazývány „přiboudlinou“ [12]. Mezi kvantitativně nejdůležitější vyšší alkoholy patří - 1-propanol, 2-methyl-1-propanol (isobutyl alkohol), 2-methyl-1-butanol a 3-methyl-1-butanol (isoamyl alkohol). Dále nejdůležitějším fenolem odvozeným od vyšších alkoholů je 2-fenylethanol [2, 5]. Vyšší alkoholy opětovně vznikají z produktů vzniklých odbouráváním cukrů během kvašení. Patří proto mezi tzv. sekundární produkty kvašení a jsou důsledkem množení kvasinek [12].

1.2.4 Dioly, polyalkoholy a cukerné alkoholy

Nejdůležitější diol ve víně je 2,3-butandiol, který má mírně hořkosladkou chuť a malý sensorický vliv, nachází ve víně v množství 4 až 7 mg/l [5, 12]. Nejvýznamnějším polyalkoholem je glycerol, který je v suchých vínech nejhojnější sloučeninou po vodě a etanolu. Glycerol má ve víně lehce nasládlou chuť, jako primární produkt kvašení dodává vínu plnost a zjemňuje chuť [5, 12, 13]. Kromě ovlivnění sensorických vlastností vína je glycerol významným zdrojem živin pro růst kvasinek [5].

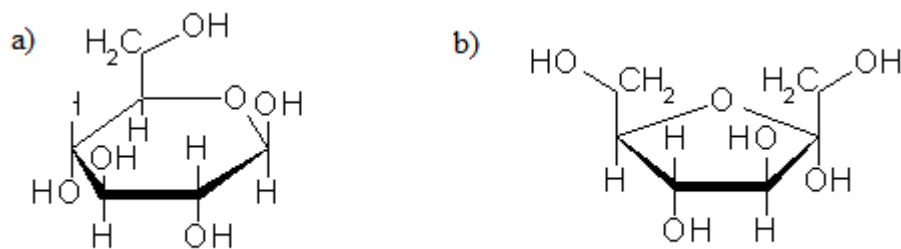
Cukerné alkoholy, jako je alditol, arabitol, erythritol, manitol, myo-inositol a sorbitol, jsou obvykle ve víně přítomny v nízkých koncentracích. Vyšší koncentrace cukerných alkoholů mají za následek plísněvé infekce ve vinici nebo bakteriální růst ve víně. Cukerné alkoholy mohou být oxidovány bakteriemi octového kvašení za vzniku jednotlivých cukrů. Polyalkoholy, kromě glycerolu, a cukerné alkoholy obecně mají pouze malý sensorický vliv na víno [2, 5].

1.3 Sacharidy

Obsah cukru určuje cukernatost, což je základní parametr pro zařazení vín do jakostních stupňů, od ní se odvíjí potenciální obsah alkoholu v budoucím víně [14].

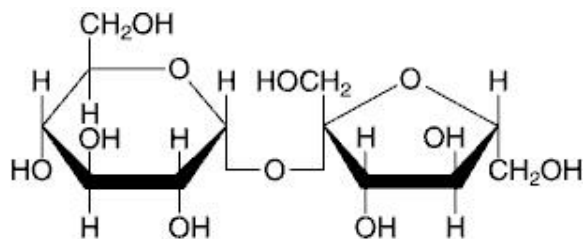
Hlavními zástupci sacharidů jsou glukóza (hroznový cukr) a fruktóza (ovocný cukr). Během procesu fermentace jsou pomocí kvasinek cukry metabolickými cestami přeměněny na etanol a CO₂ [5]. Glukóza i fruktóza jsou šestiuhlíkaté cukry. Většinou jsou jejich koncentrace ve stejném poměru, ale u přezrálých hroznů jsou koncentrace fruktózy vyšší [11].

Fruktóza se v úplně zkvašeném víně téměř nenachází. I s glukózou jsou snadno rozpustné ve vodě i v alkoholu. Fruktóza působí sladším dojmem, proto existují i sensorické rozdíly ve víně [3, 12].



Obr. 1. a) vzorec α -D-fruktóza, b) α -D-glukóza [13].

Při fermentaci je sacharóza pomocí enzymu invertázy enzymaticky rozdělena na glukózu a fruktózu [5].



Obr. 2. Vzorec sacharózy [15].

Z hlediska růstu kvasinek je důležité množství cukru v hroznech zejména pro druh *Saccharomyces cerevisiae*, který získává většinu metabolické energie z glukózy a fruktózy. Je proto důležité, aby velká část živin byly právě cukry [10].

1.3.1 Pektiny, gummy, polysacharidy

Obvykle to jsou slizovité polymery cukernatých kyselin, které drží společně rostlinné buňky. Vyskytují se jako komplexy rozvětvených řetězců. Pektiny jsou lineární polymery kyseliny galakturonové, která obsahuje více esterifikovaných methylových skupin [5, 11].

Gummy jsou polymerní směsi arabinózy, galaktózy, xylózy a fruktózy. Jsou částečně rozpustné ve vodě a jsou extrahovány do šťávy během drcení a lisování hroznů [11].

Polysacharidy společně s pektiny, gummy a glukosany způsobují u vín zamlžení a filtrační problémy. Obsah pektinů lze snížit pomocí pektináz [3].

1.4 Kyseliny

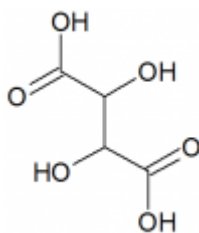
Většinu obsahu kyselin tvoří kyselina vinná a jablečná. V nevyzrálých ročnících převažuje kyselina jablečná, naopak v dobře vyzrálých ročnících převažuje kyselina vinná [12]. Bílá vína mají vyšší hodnoty celkové kyselosti než vína červená. Rozsah pH je pro bílá vína ideální mezi 3,1 – 3,4 a pro červená vína mezi 3,3 – 3,6 [5].

Obsah kyselin je důležitý také pro barvu červených vín, která je stálá při nízkých pH. Při zvýšeném pH ztrácí víno svoji červenou barvu do barvy namodralé [2, 5]. Kyseliny jsou zahrnuty do procesů srážení pektinů a proteinů, které by mohli způsobit zakalení konečného vína. Nízké hodnoty pH mají antibakteriální účinek [16].

1.4.1 Kyselina vinná

Kyselina vinná je obsažena ve vysokých koncentracích v mladých hroznech a ve víně se nachází většinou ve formě draselných solí [2, 5, 6, 10, 11].

Kvasinky kyselinu vinnou během kvašení nemetabolizují, ale asi 0,5 -1,5 g/l kyseliny vinné se vysráží jako vinný kámen (hydrogenvinan draselný) v důsledku obsahu alkoholu ve víně, který proměňuje její rozpustnost [10, 12, 13].



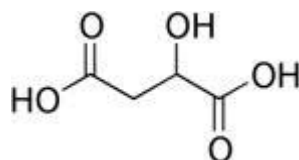
Obr. 3. Vzorec kyseliny vinné [17].

1.4.2 Kyselina jablečná

Kyselina jablečná je méně odolná proti účinku kyslíku při vyšších teplotách. Proto po dobu zrání hroznů klesá obsah této kyseliny. Koncentrace kyseliny jablečné ve víně závisí na druhu hroznů a je jedním z hlavních ukazatelů používaných k určení doby sklizně [2, 5].

Těsně před tím, než dojde k barevné změně hroznových bobulí, je kyseliny jablečné obsaženo nejvíce a dokonce její koncentrace může být až 20 g/l [2, 10]. Po dobu zrání vína, její obsah klesá dýcháním a obvykle se vyskytuje v množství 1-9 g/l [2].

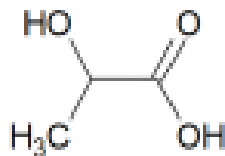
Oproti kyselině vinně je jablečná kyselina lehce zpracovávána mikroorganismy. I kvasinky přeměňují během kvašení kyselinu. Vzniká při tom alkohol, nikoliv kyselina mléčná jako při biologickém odbourávání kyselin [12, 13]. Kyselina jablečná má čistě kyselou chuť, nepůsobí zdravotní problémy ani při požití ve větším množství [18].



Obr. 4. Vzorec kyseliny jablečné [19].

1.4.3 Kyseliny mléčná

Kyselina mléčná vzniká mléčným kvašením glukózy a fruktózy. Toto odbourávání je způsobeno mléčnými bakteriemi, vzniká především kyselina mléčná a oxid uhličitý. Tento proces se nazývá jablečno-mléčné kvašení [5, 11, 20]. Toto kvašení napomáhá ke zjemnění chuti a probíhá u červených vín a některých bílých. Pro zajištění kontroly nad jablečno-mléčným kvašením se používá oxid siřičitý k potlačení těchto bakterií [6, 10].

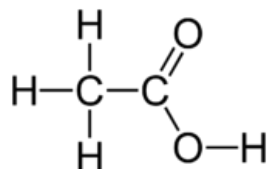


Obr. 5. Vzorec kyseliny mléčné [21].

1.4.4 Kyselina octová

Důležité jsou estery kyseliny octové, které vínu dávají ovocnou chuť. Obvyklá koncentrace ve víně je menší než 300 mg/l, v případě vyšší koncentrace dává kyselina octová vínu

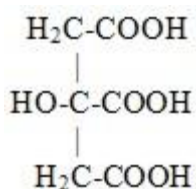
kyselou chuť a poškozuje jeho vůni [2, 5]. Vyšší koncentrace kyseliny octové jsou obvykle spojeny s kontaminací hroznů, šťávy nebo vína bakteriemi octového kvašení [3]. Při kontaktu s kyslíkem, bakterie octového kvašení přeměňují etanol na kyselinu octovou a CO₂. Tento proces se nazývá octovatění vína [10].



Obr. 6. Vzorec kyseliny octové [22].

1.4.5 Kyselina citronová

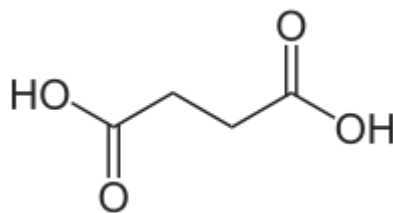
Přirozený obsah kyseliny citronové se pohybuje v rozmezí 50 -300 mg/l a může být enzymaticky odbouráván bakteriemi jablečno-mléčného kvašení. To má význam při biologickém odbourávání kyselin, kdy může vznikat diacetyl (máselná chuť) [12]. V ledovém víně je obsah kyseliny citronové zvýšen [11, 12]. Účinkem bakterií se snadno rozkládá, proto ji není možné ve všech vínech dokázat [7].



Obr. 7. Vzorec kyseliny citronové [23].

1.4.6 Kyselina jantarová

Vzniká především odbouráváním kyseliny jablečné kvasinkami a je tak pravidelně vznikajícím vedlejším produktem kvašení. Její obsah se většinou pohybuje v rozmezí do 1 g/l [12].



Obr. 8. Vzorec kyseliny jantarové [24].

1.5 Minerální látky

Obsah minerálních látek je ovlivněn půdními podmínkami, jejím geologickým původem a také klimatickými podmínkami [25].

Celkové množství se uvádí jako „obsah popelovin“ – zbytek po spálení organických součástí vína při 500 °C. Množství ve víně se pohybuje v rozmezí 1,5 - 4 g/l [12]. V nezrzašeném moštu je obsah minerálních látek vyšší než ve víně, protože část minerálních látek spotřebují kvasinky a část se ztrácí tvorbou vinného kamene [3].

Nejvíce se na popelu podílí draslík 650 až 950 mg/l, u červených vín může být jeho obsah ještě vyšší [12]. Železo a měď ve vyšších koncentracích způsobují většinou nežádoucí účinky, které se projeví zakalením vína [2]. U bílých vín je způsobeno zakalení fosforečnanem železitým. U vín červených je vzniklé zakalení dáno reakcí železitých iontů s tříslovinami [11].

Nezbytným prvkem pro správný růst hroznů je síra a její sloučeniny. Je přítomna ve všech buněčných tkáních a plní důležité kontrolní funkce. Bez využitelné síry a některých z jejich aktivních sloučenin by nebylo možné vypěstovat hrozny, fermentovat hroznovou šťávu a produkovat víno [2].

Červená vína nepotřebují vysoký přídavek SO₂ neboť přirozeně obsahují antioxidanty [6].

1.6 Dusíkaté sloučeniny

Mnoho dusíkatých sloučenin se nachází v hroznech a ve víně, které obsahují anorganické formy jako amoniak, dusičnany a organické formy jako jsou aminy, amidy, aminokyseliny, pyraziny, dusíkaté báze, pirimidiny, proteiny a nukleové kyseliny [5, 11].

1.6.1 Aminy

Jsou nejjednodušší dusíkaté látky ve víně. Těnkavé aminy jako jsou etylamin, fenyletylamin, metylamin a isopentylamin mají tendenci během fermentace snižovat svoji koncentraci, jelikož jsou metabolizovány kvasinkami. Kvasinky mohou taky aminy syntetizovat během rané fáze fermentace [2].

Celkové množství aminů se zvyšuje během autolýzy kvasinek. Víno také obsahuje malé množství netěkavých biogenních aminů. Nejstudovanější jsou tyramin a histamin, které zvyšují, respektive snižují krevní tlak [11]. Histamin se běžně vyskytuje v množství do 1 g/l vína, ale může se vyskytnout i v množství 20 g/l. Vyšší koncentrace biogenních aminů

může způsobit alergické reakce, bolesti hlavy a celkovou nevolnost [3, 9, 26]. Netěkavé aminy jsou obvykle vedlejší produkty metabolismu aminokyselin [5].

Polyaminy jako je putrescin a kadaverin jsou ve víně přítomny obvykle pouze jako výsledek bakteriální kontaminace nebo použití plesnivých hroznů. V hroznech se obvykle vyskytují v komplexech s kyselinou kumarovou, kávovou nebo ferulovou. Nemají žádný významný sensorický efekt na víno [2].

1.6.2 Amidy

Amidy nemají příliš významný vliv na vůni vína. Močovina je ve víně produkována jako vedlejší produkt metabolismu argininu a je přidávána do šťávy na podporu růstu kvasinek. Pokud není úplně odbourána na amoniak, může reagovat s etanolem a tvořit etylkarbamát (uretan), který je karcinogenní. Ke vzniku nejčastěji dochází při zahřívání během výroby. Špatné načasování větrání během fermentace může ovlivnit produkci a degradaci močoviny [2, 5].

1.6.3 Aminokyseliny

Aminokyseliny ve víně jsou různého původu. Některé pochází přímo z hroznů, jiné jsou produkovány enzymatickou degradací proteinů. V přídávku mohou být zdrojem dusíku a energie pro metabolismus kvasinek. Proto nepřímě ovlivňují vznik důležitých látek, které dávají vínu sensorické vlastnosti [27]. Mohou být metabolizovány na organické kyseliny, vyšší alkoholy, aldehydy, fenoly a laktony. Některé z nich mají trpkou, sladkou nebo hořkou chuť, mají tedy organoleptické vlastnosti [2]. V konečném vínu je jejich koncentrace zřetelně nízká, závisí na půdě a klimatických podmínkách a dále závisí obzvláště na teplotě a rychlosti kvašení během výroby vína [27].

1.7 Proteiny

Proteiny jsou obsaženy hlavně v dužnině hroznů, v konečném víně se nachází pouze v nízkých koncentracích. Jejich obsah se značně liší, je ovlivněn odrůdou i ročníkem, v suchých letech je proteinů více. Proteiny jsou sráženy během obou fermentací a zrání vína. Mohou způsobit zakalení v důsledku vysoké teploty skladování. Množství proteinů je redukováno přídávkem bentonitu, zahříváním moštu nebo přídávkem malého množství tříslovin [11, 12]. Manoproteiny, komplexy mannanů a proteinů, jsou uvolňovány

kvasinkami během autolýzy a mají vliv na kvalitu vína. Ve šťávě jsou velmi důležitou skupinou hydrolázy, kterou jsou aktivovány stiskem nebo během procesu drcení [5, 27]. Pektinázy podporují zjemnění vína a mají vliv na maceraci. Zabraňují selhání tkání a redukují vysoký obsah pektinů v hroznech. Dalšími enzymy jsou lipoxygenázy, proteázy a fenolové oxidázy [2].

1.8 Aldehydy a ketony

1.8.1 Aldehydy

Aldehydy jsou karbonylové sloučeniny, které se liší polohou karbonylové funkční skupiny ($-C=O-$). Většina aldehydů obsažených ve víně vzniká během fermentace, výroby vína nebo je extrahována z dubových sudů a má vliv na aroma. Některé aldehydy jsou během fermentačního procesu redukovány na alkoholy [2].

Acetaldehyd představuje okolo 90 % z celkového množství aldehydů. Acetaldehyd je jeden z prvních meziproductů fermentace. Je vylučován mimo buňku, a v momentě, kdy se fermentace blíží ke konci, je transportován zpátky do buněk kvasinek a redukován na etanol. Na konci fermentace je jeho množství ve víně velmi nízké. Acetaldehyd je důležitý stabilizátor barvy červených vín. Velmi často reaguje s SO_2 a je zahrnut do polymerizace antokyanů a prokyanidinů, tudíž jeho koncentrace ve vínech červených je nižší než ve vínech bílých [2, 5].

1.8.2 Ketony

Spousta ketonů je produkována během fermentace, ale pouze málo z nich má senzorické vlastnosti. Ketony jsou ve víně obsaženy ve velmi nízkých koncentracích [2]. Hlavním zástupcem ketonů je diacetyl (2,3-butandion). V nízkých koncentracích, menších jak 5 mg/l, dává diacetyl vínu příjemnou máslovou a oříškovou vůni [11]. Nad touto hranicí má diacetyl ve vínu karamelovou vůni. Ovlivnění senzorických vlastností diacetylem záleží na SO_2 , stabilitě během zrání a na přítomnosti jiných těkavých sloučenin [2]. Přítomnost diacetylu ve víně je nejčastěji spojována s jablečno-mléčným kvašením, ale i při vysokých teplotách aktivitou kvasinek během procesu fermentace [5, 11].

Dalšími ketony ve víně jsou β -damascenon, α -ionin a β -ionin. Tyto látky výrazně ovlivňují sensorické vlastnosti vína. Vůně exotických rostlin a růží je typická pro β -damascenon a vůně ostružin pro β -ionin [2].

1.9 Estery

Estery jsou kondenzační produkty reakcí mezi karboxylovou skupinou organických kyselin a hydroxylovou skupinou alkoholů nebo fenolů. Hlavním zástupcem esterů je etylacetát (etyl-ester kyseliny octové), který vzniká reakcí kyseliny octové a etanolu. Většina esterů se nachází pouze ve stopových množstvích [2]. Koncentrace etyl-esteru kyseliny octové je obvykle pod 50 – 100 mg/l. Při těchto koncentracích má vliv na komplexní vůni vína. Při vyšších koncentracích jak 150 mg/l udávají estery vínu nepříjemnou vůni, která je většinou ovlivněna bakteriemi octového kvašení [5, 13].

Důležité jsou estery kyseliny octové s alkoholy a estery etanolu s nasycenými mastnými kyselinami nebo netěkavými organickými kyselinami. Jejich ovocná vůně je důležitým faktorem buketu některých bílých vín [5]. Důležitost esterů v případě vůně u vín červených není dosud dostatečně vysvětlena. Většina esterů nalezených ve víně je produkována kvasinkami. Na konci fermentace jsou estery většinou v nadbytku a tak dochází k hydrolýze na původní složky, doprovázené vysokými teplotami a nízkým pH.

Pro vína, u kterých je vůně založena hodně na esterech, může zrání vína způsobit slábnutí jejich vůně. Naopak u esterů dikarboxylových kyselin se během zrání jejich koncentrace většinou zvyšuje [2].

1.10 Fenolické látky ve víně

Fenolické látky ve víně představují velkou skupinu sloučenin, které působí na chuť, barvu a vůni vína. V červených vínech je jejich koncentrace vyšší než v bílých vínech [11]. Fenolické látky je možno rozdělit na dvě skupiny - flavonoidy a ne-flavonoidy.

Mezi flavonoidy patří flavonoly, antokyany, třísloviny a katechiny, které udávají barvu a chuť vína. Mezi ne-flavonoidy náleží stilbeny jako je resveratrol a sloučeniny odvozené od kyseliny benzoové, kávové a skořicové.

U hroznů jsou fenolické látky obsaženy většinou ve slupce, stonku a v semenech. Sluneční světlo má během růstu hroznů vliv na zvýšení koncentrace fenolických látek v bobulích. Tato koncentrace může být zvýšena také procesem macerace, která je charakteristická pro

červená vína. Většina fenolů je klasifikována jako sekundární metabolity, které jsou velmi často uloženy jako glykosidy ve vakuolách [2].

1.10.1 Flavonoidy

V červeném víně tvoří až 90 % vinného obsahu fenolických sloučenin. V bílých vínech je množství flavonoidů redukováno díky menšímu kontaktu slupky hroznů během výroby vína [11]

1.10.1.1 Flavonoly

Hlavními flavonoly jsou kaempferol, quercetin a myricetin. Flavonoly obsahují světle-žlutý antoxanthinový pigment a má veliký význam jako antioxidanty a protirakovinné látky [11].

Společně s antokyany absorbují UV záření, a tím chrání vnitřní tkáň před poškozením [2].

1.10.1.2 Antokyany

Antokyany jsou ve víně jako glykosidy složeny z aglykonu (antokyanidinu) (flavonoidová část) a cukru. Cukernou složkou bývá většinou glukóza a spolu s aglykonem jsou vázány pomocí glykosidické vazby. Množství antokyanů je hlavním zdrojem zbarvení červených vín [2].

Nemalý vliv na snížení obsahu antokyanových barviv má také čiření nebo filtrace vína [28]. Antokyany jsou závislé na pH, jejich barva se mění s pH od kyselých červených po modré zásadité barvy [10]. Jedná se o významné antioxidanty. Bílá vína o nízkých koncentracích antokyanů, mají menší oxidační charakter. Snadněji oxidují a může docházet k hnědnutí vína [2].

Ve fotosyntetizujících tkáních chrání buňky před poškozením způsobeným absorbovaným UV zářením a dále chrání buňku před fotoinhibicí a stresem [2].

1.10.1.3 Třísloviny

Třísloviny, jsou různorodá skupina chemických látek ve víně, které mají vliv na barvu, stárnutí a texturu vína. Ve větším množství dávají trpkou, až svíravou nebo drsnou chuť [10]. Množství tříslovin ve víně závisí obecně na druhu vína.

Třísloviny se nacházejí v bobulích nebo mohou být do vína uvolňovány skladováním v dubových sudech nebo přidavkem tříslovitého prachu nebo drti [2]. Třísloviny mají schopnost reagovat s proteiny. Při jejich nadbytečném množství ve víně, je potřeba použít albumin, kasein nebo želatina, které mají schopnost vytvořit sraženinu a sedimentovat na dno [11].

Kromě antibakteriálních účinků posilňují imunitní systém, snižují krevní tlak a riziko vzniku nádorů. Při konzumaci většího množství červeného vína na lačno mohou taniny způsobit migrény [29]. Množství se pohybuje kolem 1 – 2 g/l [3].

1.10.1.4 Ostatní flavonoidy

Katechiny jsou flavonoidy, které přispívají k hořkosti vín a hrají roli při mikrobiální ochraně hroznových bobulí. V případě napadení hroznů nemocemi, jako je například řepná plíseň, jsou produkovány ve vyšších koncentracích. Chladné a vlhké podnebí také napomáhá k jejich vyšší produkci. Společně s antokyany a tříslovinami zvyšují stabilitu barvy vína. Od flavonolů se odlišují nepřítomností ketonové skupiny ve struktuře [2].

1.10.2 Ne-flavonoidy

Základní ne-flavonoidy jsou deriváty kyseliny hydroxyskořicové a hydroxybenzoové. Jsou uloženy v buněčných vakuolách, v dužnině a slupce a jsou snadno extrahovatelné. Hlavní zástupci derivátů kyseliny hydroxyskořicové a jejich estery s kyselinou vinnou hrají důležitou roli v oxidativním hnědnutí moštu. V malém množství mohou oxidované deriváty těchto kyselin dát slámově žlutou barvu bílým vínům. V červených vínech jsou ale zastíněny barvami, které dávají antokyaniny a prokyaniny.

Hlavní zástupce derivátů hydroxybenzoové kyseliny je kyselina ellagová. [2]. Degradací ligninu v dubovém dřevě se uvolňuje skořicový aldehyd a deriváty benzaldehydu jako například vanilin. Metabolismem kvasinek se zase uvolňuje tyrosol [6].

Speciální skupinou fenolických látek ve víně jsou stilbeny. Hlavním zástupcem je resveratrol, nachází se většinou ve slupce hroznových bobulí. Vyskytuje se asi 10krát více ve vínech červených než ve vínech bílých. Resveratrol se nachází ve vyšších koncentracích u vína v chladném a vlhkém prostředí. Používá také jako potravinový doplněk, díky svým protizánětlivým a protirakovinovým vlastnostem [5].

1.11 Lipidy

Všechny lipidy jsou důležité pro strukturu a funkci rostlinných a kvasinkových buněk. Ale pouze oleje, vosky a steroly mají vliv na kvalitu vína. Oleje se obvykle ve víně nevyskytují, ale při drcení vína může dojít vlivem nadměrného tlaku k uvolnění oleje ze semínek hroznů. Po oxidaci mohou tyto oleje tvořit žluknutí, což je nežádoucí kontaminace vína.

Víno obsahuje pouze malé množství těchto látek, okolo 00,05 -0,1 g/l [3].

Z listů se může uvolnit malé množství kyseliny linolové a linolenové, jejichž oxidací poté uvolňují aromatické šestiuhlíkaté aldehydy a alkoholy, které produkují bylinnou vůni a trpkou až hořkou chuť [5].

Na přítomnosti sterolů a nenasycených mastných kyselin závisí růst a metabolická aktivita kvasinek. Hlavní složkou hroznového vosku je kyselina oleanolová. Oba dva typy lipidů pomáhají udržovat membránovou funkci a zlepšit kvasnou odolnost alkoholu v průběhu fermentace a po ní [2, 5].

1.12 Vitamíny

Obsah vitamínů se liší podle jednotlivých odrůd, je ovlivněn také technologickým postupem výroby vína. Červená vína mají většinou vyšší obsah vitamínů než bílá. Nejvíce jsou obsaženy vitamíny skupiny B. Jejich koncentrace obvykle klesá během fermentace a zrání vína [3, 5, 9].

Tiamin (vitamín B₁) má schopnost snižovat množství alkoholu v krvi po jeho požití. V červeném víně se nalézá v množství 7 až 10 mg/l. Tiamin je odbouráván reakcí s SO₂, působením tepla nebo adsorpcí na bentonit [30].

Riboflavin (vitamín B₂) je oxidován po vystavení na světlo. Ve víně se nalézá v množství 0,5 mg/l [5]. Kyselina pantotenová (vitamin B₅) ve víně je přítomna v množství 1,2 až 1,5 mg/l. Pyridoxin (vitamin B₆) se vyskytuje ve třech formách – pyridoxal, pyridoxal a pyridoxamin. Ve víně se nalézá v množství 0,5 mg/l. Kobalamin (vitamin B₁₂) ve víně je přítomen pouze v množství menším než 0,16 mg/l. Kyselina nikotinová a její amid (vitamin B₃, PP, niacin) ve víně se nalézá v množství 1 až 2 mg/l. Biotin (vitamin H) je přítomen v množství 5 mg/l [2, 5].

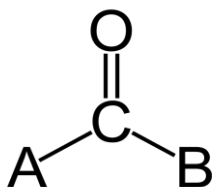
Kyselina askorbová (vitamín C) je rychle oxidována již při rozměňování hroznů, ve víně je ho velmi malé množství [2, 5].

2 DIKARBONYLOVÉ SLOUČENINY

2.1 Karbonylové sloučeniny

Karbonylové sloučeniny jsou především organické sloučeniny, které obsahují karbonylovou skupinu, která se skládá z uhlíkového atomu vázaného dvojnou vazbou ke kyslíkovému atomu C=O. V organické chemii je samotná karbonylová skupina obsažena v aldehydech a ketonech. V systematickém názvosloví je ve sloučenině karbonylová skupina vždy na druhém místě [31, 32, 33].

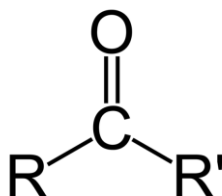
Těkavé aldehydy a ketony patří k nejdůležitějším vonným a chuťovým látkám. Vyskytují se v potravinách jako primární látky, nebo vznikají enzymovými nebo chemickými reakcemi. Často jsou žádoucími složkami aroma potravin, ale mohou vznikat i nežádoucí vůně a chuti [15].



Obr. 9. Vzorec karbonylové skupiny [32].

2.1.1 Ketony

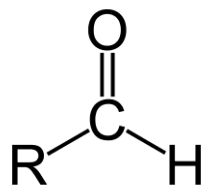
Ketony jsou organické sloučeniny, které obsahují ketoskupinu C=O uprostřed uhlovodíkového řetězce. V chemickém názvosloví se k názvu uhlovodíku přidává koncovka -on. Do skupiny ketonů patří 2,3-butandion. Na karbonylovou skupinu jsou vždy navázány dva uhlíkaté zbytky [31, 34]. Více je popsáno v kapitole 1.8.2.



Obr. 10. Vzorec ketonu [32].

2.1.2 Aldehydy

Jsou organické sloučeniny, které obsahují aldehydickou funkční skupinu -COH. Její přítomnost v molekule se vyjadřuje koncovkou -al, která se připojí k názvu uhlovodíku. Pokud karbonylová skupina není součástí hlavního řetězce, vyjadřuje se koncovkou -karbaldehyd. Mezi nejvýznamnější aldehydy patří acetaldehyd, benzaldehyd a formaldehyd [31, 34]. Více je popsáno v kapitole 1.8.1.



Obr. 11. Vzorec aldehydu [33].

2.2 Hlavní dikarbonylové sloučeniny

Dikarbonylové sloučeniny jsou organické látky, v jejichž molekule jsou obsaženy dvě karbonylové skupiny [15]. Tyto dvě karbonylové skupiny mohou být od sebe různě vzdáleny a podle jejich vzdálenosti dělíme tuto skupinu sloučenin na α (1,2), β (1,3), γ (1,4), dialdehydy nebo diketony, případně aldehydкетony [35].

Mezi hlavní dikarbonylové sloučeniny ve víně řadíme glyoxal, methylglyoxal (aldehyd pyrohroznové kyseliny), diacetyl a pentan-2,3-dion. Dikarbonylové sloučeniny se vyskytují ve všech druzích vína, zvláště po jablečno-mléčném kvašení a zejména u červených vín. Výjimkou jsou bílá „botrytická vína“, která obsahují vysoké koncentrace glyoxalu a methylglyoxalu. Botrytická vína jsou vyrobená z hroznů, které jsou napadeny ušlechtilou plísní *Botrytis cinerin* (plíseň se vyskytuje za dlouhých teplých podzimů a způsobuje napadení hroznů a jejich vysušení – bobule se podobají suchým scvrklým rozinkám) [36, 37].

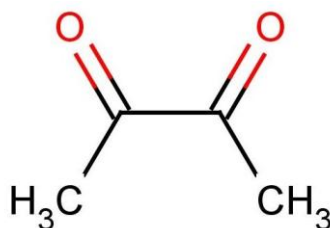
Nejdůležitější látky, které se podílejí na aroma vína jsou diacetyl a pentan-2,3-dion. Aromový práh diacetylu u vína je v rozmezí od 0,2 – 12 mg/l podle druhu vína. Všechny dikarbonylové sloučeniny jsou syntetizovány *Saccharomyces cerevisce* v průběhu alkoholového kvašení a *Oenococcus oeni* během jablečno-mléčného kvašení [15].

Mléčné bakterie se ve vinařství podílejí na biologickém odbourávání kyselin, nazývaném také jablečno-mléčné kvašení. Základním procesem, který bakterie způsobují, je enzymatická přeměna kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou. V průběhu tohoto biologického procesu se vytváří velké množství vedlejších produktů, které mohou způsobovat snižování kvality vína. V průběhu odbourávání kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou se víno sensoricky mění. Chuť a vůně vína v tomto stádiu připomínají „staré plesnivé maso“, či ještě běžněji „zkažené kysané zelí“. Zcela jasným původcem je ve víně diacetyl. Diacetyl je chuťově i aromaticky aktivní sloučenina. V úměrných koncentracích – u bílých vín 1 mg/l, u červených vín 5 mg/l – může příjemně doplňovat a zjemňovat chuť a aroma vína. Při vysokých koncentracích, kdy připomíná kysané zelí, jde především o negativní ovlivnění vína. Tvorba diacetylu je silnější, pokud došlo ke spontánnímu biologickému odbourávání kyselin divokými bakteriemi *Pediococcus* a *Lactobacillus* [38].

2.2.1 Diacetyl a pentan-2,3-dion

Nejznámější sloučeninou je diacetyl. Je doprovázen 2,3-butandiolem, který vzniká redukcí acetoinu [39].

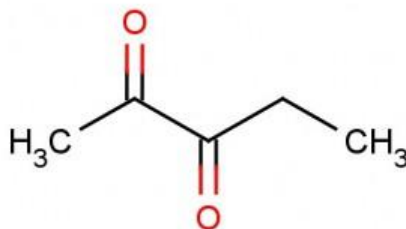
Diacetyl má příjemnou vůni másla a lískových oříšků, která je patrná i při nízkých koncentracích 2 mg/l. Ale zpravidla je diacetyl ve víně obsažen v koncentraci okolo 0,3 mg/l. [40]. Diacetyl má i ostrou, dráždivou vůni a chuť, ve zředění připomínající máslo. Obsah v máse bývá okolo 4 mg/kg. V alkoholických nápojích jsou však tyto látky ne zcela žádoucí, neboť jsou indikátorem oxidace nebo nežádoucí bakteriální kontaminace. Červená vína mívají o něco vyšší obsah diacetylu než vína bílá. [39].



Obr. 12. Vzorec diacetylu [41].

Diacetyl vzniká v menším množství i jako vedlejší produkt rovněž při fermentaci piva. V pivě není jeho přítomnost žádoucí, a proto se pivo nechává dokvášet. Diacetyl je v pivu obsažen přibližně v množství 0,05 mg/l. Výjimkou mohou být některá černá piva, která

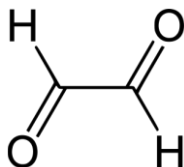
můžou obsahovat až 0,6 mg/l. Množství větší než 1,0 mg/l je bráno jako vada. Pro svoji chuť a aroma je diacetyl přidáván do řady potravin, jako například do margarínů nebo popcornu [42].



Obr. 13. Vzorec pentan-2,3-dionu [41].

2.2.2 Glyoxal

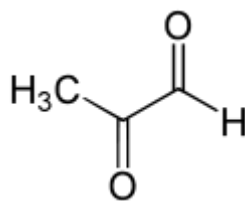
Tepelné zpracování potravin vede ke vzniku dikarbonlových sloučenin jako glyoxal (GO) a methylglyoxal (MGO), jsou potenciálně škodlivé, protože jsou prekurzory produktů glykace (AGE) [52]. Malé množství GO a MGO se přirozeně vyskytuje v zelených kávových zrnech. Nejvyšší obsah mají v lehce a středně pražené kávě, zatímco tmavě pražená káva obsahuje menší množství [46].



Obr. 14. Vzorec glyoxalu [43].

2.2.3 Methylglyoxal

Methylglyoxal, je aldehyd pyrohroznové kyseliny. V organismu je tvořen jako vedlejší produkt při několika metabolických drah. Methylglyoxal vzájemně působí s negativně nabitými nukleofilními centry buněčných makromolekul v eukaryotických i prokaryotických buňkách. Je běžným meziproduktem při nen enzymatické glykaci proteinů. Reaguje také s guaninem, tak jako adeninem a cytosinem, v nukleových kyselinách a je mutagenní u bakterií. MGL inhibuje růst bakterií, a při vyšších koncentracích je baktericidní [44]. Z tří uhlíkatých sloučenin se vyskytuje hlavně methylglyoxal a produkty jeho reakce jsou acetol a 1,2-propandiol. Z vyšších homologů jsou důležité 3-hydroxy-2-pentanon, 2,3-pentandion, 2,3-pentandiol. V alkoholických nápojích vznikají jako vedlejší produkty kvašení cukrů, především při jablečno-mléčném kvašení.



Obr. 15. Vzorec methylglyoxalu [43].

3 STANOVENÍ DIKARBONYLOVÝCH SLOUČENIN U VÍNA

Dikarbonylové sloučeniny lze stanovovat různými instrumentálními metodami, jako jsou kolorimetrie, gravimetrie, spektrofotometrie, plynová a kapalinová chromatografie.

3.1 Kolorimetrická metoda

Kolorimetrie je metoda založená na srovnávání intenzity zabarveného roztoku o neznámé koncentraci s roztokem téže látky o známé koncentraci. Intenzita zabarveného roztoku se měří pomocí kolorimetru. Kolorimetrie je neselektivní, jelikož zde zasahuje mnoho sloučenin, tím chromatografické metody dávají spolehlivé kvantitativní stanovení [45].

Kolorimetrické stanovení diacetylu je založeno na reakci s keratinem v přítomnosti α -naftolu.

3.2 Gravimetrická metoda

Gravimetrii řadíme mezi chemické metody kvantitativní analýzy. Gravimetrie je založena na vyloučení stanovované složky ve formě málo rozpustné sloučeniny na sloučeninu o přesně definovaném složení [18, 47].

Diacetyl (biacetyl, 2,3-butandion) se po převedení na oxim sráží v alkalickém prostředí nikelnatou solí jako bis(diacetyldioximáto)-nikelnatý komplex (červená sraženina). Sraženina se po promytí a vysušení zváží [47].

3.3 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je analytická metoda založená na interakci elektromagnetického záření s analyzovaným roztokem. Vychází z Lambert-Beerova zákona, principem stanovení diacetylu pomocí spektrofotometrie je destilace diacetylu ze vzorku s vodní parou za přídavku o-fenylendiaminu a zjištění absorpance [48].

3.4 Kapalinová chromatografie

Mezi metodami kapalinové chromatografie zaujímá významné místo HPLC (vysoce účinná kapalinová chromatografie). Mobilní fází je kapalina a stacionární fází je film příslušné látky zakotvený na povrchu nosiče nebo pevný adsorbent. HPLC analýza je citlivá na složení a pH mobilní fáze [49].

U kapalinové chromatografie se obvykle pracuje eluční metodou, při které se vzorek vymývá nosnou mobilní fází. Mobilní fáze při eluční metodě se nazývá eluent, z kolony

vychází eluát. Jako mobilní fáze se používají běžná rozpouštědla nebo jejich směsi. Při izokratické eluci je mobilní fáze tvořena jednou látkou [47].

3.4.1 Kapalinový chromatograf

Kapalinový chromatograf je přístroj, na kterém se provádí HPLC analýza. Aparaturou protéká mobilní fáze, která je ze zásobních lahví vedena přes vysokotlakou pumpu do kolony. Dávkovačem je do proudu mobilní fáze nadávkován vzorek (dávkovačem několik málo μl). Působením gravitační síly mobilní fáze postupuje kolonou, kde dochází k separaci jednotlivých složek. Výstup z kolony vede do detektoru, signál z detektoru je zaznamenáván pomocí PC a vytištěn v podobě chromatogramu. K účinné separaci je třeba použít dostatečně malých zrníček sorbentu které prostupující kapalině kladou značný odpor. Proto je důležité pracovat za vysokého tlaku [49].

Kapalinový chromatograf je složen:

- **Čerpadlo** – kapalina se do kolony čerpá pomocí pístových nebo membránových čerpadel, dobré čerpadlo docílí průtoku v rozsahu od mikrolitrů do desítek mililitrů za minutu při 35MPa.
- **Směšovací zařízení** – složení mobilní fáze může zůstat stálé (izokratická eluce) nebo se během separace mění (gradientová eluce). Naprogramované směšovací zařízení může s využitím zásobníků různých kapalin připravovat směs kapalin stálého složení nebo řídit změny ve složení výsledné mobilní fáze v průběhu separace.
- **Dávkovací zařízení** – v současné době bývají injekční systémy nahrazeny dávkovacím kohoutem. Vzorek je dávkován do proudu mobilní fáze pomocí dávkovací smyčky nebo automatického dávkovače. Dávkovací smyčka má obsah 10 nebo 20 μl .
- **Kolona** – kolony jsou vyrobeny z nerezové oceli o vnitřním průměru 4,6 nebo 5 mm, vnějším průměru $\frac{1}{4}$ palce (2,54 cm) a délce 5, 10, 15 nebo 25 cm, která je naplněna stacionární fází. Stacionární fáze je tvořena mikročásticemi silikagelu (3-10 μm), na kterých je navázána vlastní stacionární fáze. Běžný průtok eluentu je 1-2 ml/min.
- **Detektor** – je zařízení určené k detekování složek již odseparované směsi. V HPLC se používá celá řada detektorů.

a) Spektrofotometrický - nejvíce se v praxi používají spektrofotometrické detektory. Jsou vysoce selektivní, základem je, aby při dané vlnové délce detekovaná látka absorbovala co nejvíce. Vlnovou délku lze naprogramovat.

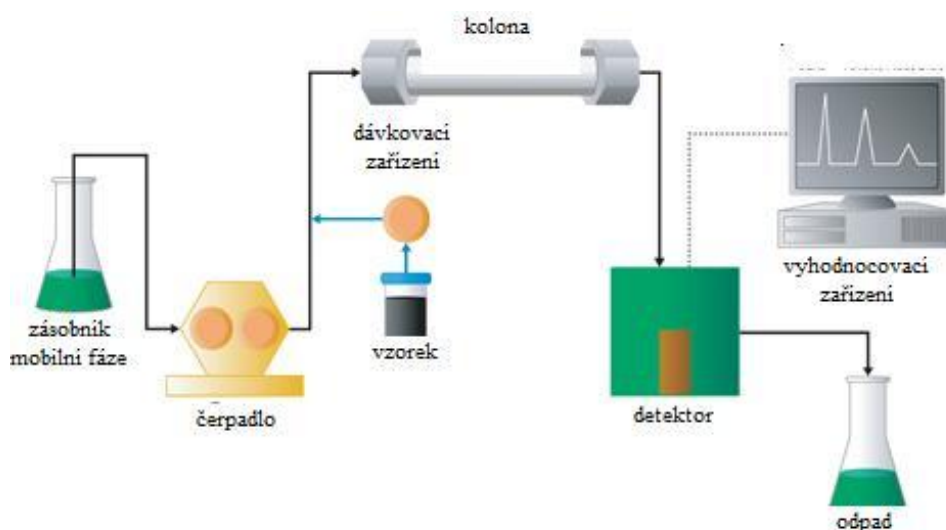
b) Fluorescenční - je založen na principu fluorescence – schopnosti látek absorbovat UV a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření. Detektor má detekční limit až 10^{-12} g/ml a je vysoce selektivní.

c) Refraktometrický - měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Tento typ detektoru sice není příliš citlivý (detekční limit 10^{-7} g/ml), ale je velmi univerzální. Při jeho použití je třeba přesně udržovat konstantní teplotu.

d) Hmotnostní detektor - je použitelný jak plynové tak i v kapalinové chromatografii pro přímou identifikaci látek.

e) Elektrochemický detektor – lze použít tam, kde jsou v roztocích obsaženy ionty respektive složky oxidovatelné nebo redukovatelné na polarizovatelné elektrodě.

- **Vyhodnocovací zařízení** – Vyhodnocení chromatografu se provede pomocí počítačového softwaru [49].



Obr. 16. Schéma kapalinového chromatografu [50].

3.4.2 Stanovení obsahu dikarbonylových sloučenin pomocí kapalinové chromatografie

Detekce dikarbonylových sloučenin ve víně za vzniku chinoxalinových derivátů

Vzorek s 10 ml vína byl pomocí hydroxidu sodného upraven na pH 8, dále bylo přidáno 5 mg 2,3-diaminobenzenu. Reakční směs byla udržována při teplotě 60°C po 3 hodiny. Po ochlazení roztok obsahující chinoxalin se přímo zavedl do HPLC. 20 µl roztoku se vstříklo do kapalinového chromatografu pro systém HPLC. Sloupec byl Spherisorb ODS2 (250mm x 4,6mm x 5mm) od Interchromu a UV detektor waters 440 při 313nm [50].

Pro separaci mobilní fáze byl optimalizován, voda /kyselina octová 0,5% ± metanol: 0/20, 8/50, 26/75, 30/100, 32/100, 40/0, 45/20, 50/20 (čas v min / % methanolu), rychlost toku byl 0,6 ml/min [45].

Stanovení ketokyselin a dikarboxylových sloučenin a klíčových mailardových meziproduktů na generaci stáří vína.

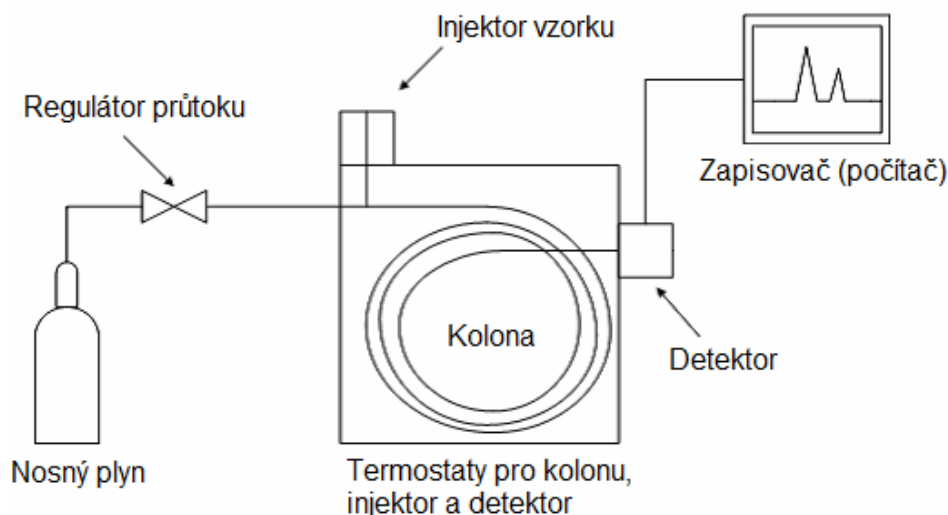
Vzorek s 40ml vína byl smíchán s 50µl standartu (25 mg/l 2,3-hexandionu v ethanolu) a 1g procházel pevnou fází extrakční kolony. Sloupec byl promýván 5 ml vody. Dále byl přidán 1,2-diaminobenzen v množství 0,05 g a pomocí H₂SO₄ byl upraven na pH 2. Vzorky byly uchovány po dobu 3 hodin při 60°C. Poté následovalo opět promývání sloupce 5ml vody a chinoxalinové deriváty se extrahovali z kolony 4ml acetonitrilu. Při použití ručního sloupce byly vstříknuty až poslední 2 ml, první 2 ml byly zamítnuty. U Commercial sloupce první 1ml byl zamítnut, další 2ml byly vstříknuty a poslední 1ml byl zamítnut [51].

3.5 Plynová chromatografie

Je analytická separační metoda, která má zastoupení v analýze těkavých látek. Jako mobilní fázi používá plyn a stacionární fázi kapalinu zakotvenou na povrchu pevné látky. Přístroj se nazývá plynový chromatograf [49].

Mezi hlavní výhody této techniky patří jednoduché a rychlé provedení analýzy, účinná separace látek a malé množství vzorku potřebné k analýze.

Existuje mnoho variant, v praxi jsou nejvíce rozšířené plynové chromatografy s kapilárními kolonami. Obrázek 15 zachycuje schématicky uspořádání plynového chromatografu.



Obr. 17. Schéma plynového chromatografu [49].

- **Zásobník nosného plynu** - nosný plyn tvoří mobilní fázi. Nejčastěji bývá nosným plynem vodík, dusík, helium nebo argon.
- **Regulátor průtoku nosného plynu** - zajišťuje stálý nebo programově se měnící průtok nosného plynu a vzorku kolonou
- **Dávkovací systém (injektor)** –slouží k zavedení vzorku do proudu nosného plynu, provádí se ručně nebo automaticky speciální injekční stříkačkou.
- **Termostat** – zajišťuje dostatečně vysokou teplotu dávkovače, kolony, detektoru, aby byl vzorek udržen v plynném stavu.
- **Chromatografická kolona** - samotné místo separace složek.
 - a) náplňové kolony (délka 0,5 až 5 m, průměr 2 až 5 mm) - jsou naplněné stacionární fází.
 - b) kapilární kolony (délka 10 až 100 m, průměr 0,01 až 0,5 mm) - stacionární fází tvoří jen povrch kolony.
- **Detektor** – je zařízení určené k detekci látek v nosném plynu. Nejvíce používaný v GC je plamenově ionizační a hmotnostní detektor.
 - a) Plamenově ionizační detektor (FID) – univerzální detektor vyznačující se dobrou citlivostí a mezí detekce (až 10-12 g/ml). Molekuly plynu se ionizují v kyslíkovém plameni a vedou ionizační proud mezi elektrodami. Nosný plyn se před vstupem do hořáku mísí s vodíkem, vzduch je přiváděn z vnějšku. Přítomnost složky zvýší ionizaci a elektrický proud se zvětší. FID detekuje prakticky vše, s výjimkou organických par a plynů.

- b) Hmotnostní - vyznačuje se nižší mezí detekce (detekční limit 10^{-13} g/ml). Na rozdíl od FID ho lze přímo použít pro identifikaci látek.
- **Zapisovač** - vyhodnocovací zařízení – počítač, zpracovává signál z detektoru, zakresluje chromatografickou křivku (chromatogram) a provádí její vyhodnocení [52].

3.5.1 Stanovení obsahu dikarboxylových sloučenin pomocí plynové chromatografie

Detekce dikarboxylových sloučenin ve víně tvorbou chinoxalinových derivátů.

50 μ l vnitřního standardu (1,2 g/l hexan-2,3-dionu v 50 % obj. alkohol. roztoku) byl přidán k 50 ml vína a 5 ml vodného roztoku 1,2-diaminobenzenu. Pomocí NaOH bylo pH upraveno na pH 8. Dále byl udržován po dobu 3 hodin při 60 °C a poté okyselen 2M kyselinou sírovou na pH 2 a extrahován dvakrát 5 ml dichlormethanu. Organická fáze byla vysušena síranem sodným a 2 ml byly vstříknuty do chromatografu. Pro GC±MS analýzu Hewlett packard HP 5890 plynový chromatogram byl spojen s HP 5970 hmotnostním spektrofotometrem (elektronový vliv 70 eV, 2,7 kV), sloupec byl BP21 (SGE, 5 0m x 0,32 mm x 0,25 μ m). Teplota vstřikovače a detektoru byla 250 °C a 280 °C. Teplota byla udržována na 60 °C po dobu 1 min a naprogramovaná rychlost z 20 °C/min na 220 °C poslední krok trval 20 minut [45].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce v teoretické části, bylo popsat chemické složení vína, dikarbonylové sloučeniny, které jsou přítomny ve víně, a dále uvést způsoby, kterými se dají dikarbonylové sloučeniny stanovit.

Cílem diplomové práce v praktické části, bylo stanovit diacetyl, methylglyoxal, glyoxal a pentan-2,3-dion pomocí HPLC ve vzorcích vín.

5 MATERIÁL A METODIKA PRÁCE

5.1 Použité chemikálie

- Standardy dikarbylových sloučenin (diacetyl, glyoxal, methylglyoxal, pentandion) (firma Sigma – Aldrich, St. Louise)
- 2,3-diaminobenzen (firma Sigma – Aldrich, St. Louise)
- Hydroxid sodný (Fisher scientific)
- Kyselina octová (Fisher scientific)
- Etanol (Fisher scientific)
- Metanol (Fisher scientific)
- Redestilovaná voda (AquaOsmotic)

5.2 Přístroje a pomůcky

- Běžné laboratorní vybavení (laboratorní sklo a pomůcky)
- Mikrofiltry MS Nylon Syringe Filter 25mm, 0,45 μm (Chromservis s.r.o.)
- pH metr (Chromservis, Eutech instruments)
- magnetické míchadlo (HEIDOLPH MR 1000)
- vodní lázeň
- HPLC (PERKIN ELMER FLEXAR UHPLC)
- Analytické váhy (Labicom)

5.3 Analyzovaný materiál

Analyzovaným materiálem bylo červené víno vyrobeno z odrůdy Frankovka. Víno pocházelo ze sklizně 2008 z vinařské oblasti Morava. Byly použity vzorky, které po ukončení hlavního kvašení byly stočeny do dvou tanků. Následně byl tank 1 zaočkován preparátem pro řízenou malolaktickou fermentaci (MLF) Lalvin 31, jedná se o nově selektovaný kmen malolaktických bakterií vyšlechtěný ve Francii. Bakterie výrazně snižují

riziko infekce a i v obtížných podmínkách se vyznačují obrovskou schopností přizpůsobení se prostředí [53]. Tank 2 byl zaočkován preparátem BioStar Vitale SK11, jedná se o vysoce koncentrovanou startovací kulturu pro přímé spuštění jablečno-mléčné fermentace v červeném a bílém víně [54]. Oba preparáty obsahovaly bakterie *Oenococcus oeni*. V obou tancích byla zajištěna optimální teplota pro správný průběh MLF, byl hlídán obsah oxidu siřičitého a pH (hodnota pH nad 3.0, volný oxid siřičitý méně než 15 mg.l^{-1} a teplota nad $16 \text{ }^\circ\text{C}$). Z každého tanku bylo provedeno celkově 15 odběrů v průběhu 93 dní následujícím způsobem (den -1 (před inokulací), 0 (inokulace), 1, 2, 3, 4, 6, 7, 14, 24, 31, 63, 69, 84, 92).

5.3.1 Úprava vzorků před stanovením

Před stanovením byly vzorky vína uchovávány ve zmrazeném stavu v tmavých plastových nádobách o objemu 250 ml. Vzorky před vlastním stanovením byly šetrně rozmrazeny a přefiltrovány pomocí Syringe filtrů.

5.4 Metodika

Pro stanovení dikarbonylových sloučenin ve víně byla použita metoda HPLC-UV po derivatizaci s 2,3-diaminobenzenem podle článku *The detection of α -dicarbonyl compounds in wine by formation of quinoxaline derivatives*, podle autorů GILLES DE REVEL, PRIPIS- NICOLAU, L., BARBE, J.,CH.,BERTRAND, A., uvedeném v Journal of the Science of Food and Agriculture (2000).

5.4.1 Postup pro stanovení jednotlivých dikarbonylových sloučenin ve víně

Po šetrném rozmrazení bylo odpipetováno 25 ml vzorku vína do Erlenmeyerovy baňky, a následně odměrným roztokem NaOH upraven na pH 8. Odměrný roztok NaOH byl přidáván po kapkách v delších časových intervalech a současně bylo prováděno měření pomocí pH metru. Poté byl ke vzorku vína přidán 2,3-diaminobenzen v množství 5 mg, a uzavřená baňka s reakční směsí byla udržována po dobu 3 hodin ve vodní lázni při teplotě $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Z vodní lázně byl vzorek odebrán, ochlazen a pomocí mikrofiltru přefiltrován do mikrozkušavky. V této fázi byl vzorek připraven na zavedení do systému HPLC.

Měření vzorků proběhlo na Perkin Elmer Flexar UHPLC, podmínky metody byly modifikovány pro použití kolony Phenomenex Gemini-NX $3 \mu\text{m C} 18 110\text{\AA}$ (Torrance,

USA) s předkolumnou SecurityGuard od stejné firmy. Při analýze byla využita izokratická metoda, a mobilní fázi představoval 2 % vodní roztok kyseliny octové a metanol v poměru 95 : 5. Průtok fáze byl nastaven na hodnotu $0,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

Jak již bylo zmíněno, pomocí metody HPLC-UV po derivatizaci vzorku 2,3-diaminobenzenem bylo stanoveno množství diacetylu, glyoxalu, methylglyoxalu a pentandionu obsaženého ve vzorcích vín. Výsledky jednotlivých dikarbonylových sloučenin jsou uvedeny v následujících tabulkách 1 až 4 a jejich jednotlivé grafické závislosti jsou uvedeny v příloze.

Tab. 1. Obsah diacetylu ve vzorcích vína

Den odběru vzorku	Tank 1		Tank 2	
	\bar{c} [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	SD	\bar{c} [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	SD
-1	79,9	0,09	83,7	1,37
0	83,6	1,36	85,0	1,07
1	125,8	1,91	182,1	1,91
2	156,6	2,08	182,9	0,34
3	142,5	0,48	199,5	0,74
4	130,8	1,81	226,2	1,61
6	106,9	0,82	233,3	1,18
7	99,3	0,58	233,8	1,24
14	87,2	0,33	239,1	0,98
24	73,8	0,11	245,6	0,89
31	73,7	1,58	247,0	1,24
63	72,7	0,47	251,6	1,45
69	72,5	0,05	260,6	2,31
84	70,6	1,28	256,7	1,84
92	70,0	0,55	276,7	4,13

U tabulky 1 a grafu na obr. 18 vyplývá, že u Tanku 1 došlo k nárůstu diacetylu první den po zaočkování. Nejvyšší koncentrace dosáhla po 2 dnech, a po této nejvyšší dosažené koncentraci začala koncentrace diacetylu pozvolna klesat až do 92. dne.

U vína z tanku 2 došlo k nárůstu diacetylu také první den po zaočkování a to dokonce o dvojnásobek původní koncentrace. Dále se koncentrace pozvolně zvyšovala až do 92. dne, kdy hodnota diacetylu dosáhla až trojnásobku původní koncentrace.

Tab. 2. Koncentrace glyoxalu ve vzorcích vína

Den odběru vzorku	Tank 1		Tank 2	
	o c [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	SD	o c [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	SD
-1	118,9	0,70	120,0	2,83
0	118,4	2,42	122,2	2,65
1	118,8	3,30	124,6	2,36
2	121,0	2,48	165,1	2,32
3	123,0	1,01	201,8	6,27
4	164,2	6,04	209,4	3,50
6	195,5	2,07	204,6	1,73
7	202,4	3,68	171,4	4,58
14	198,9	2,16	146,6	0,72
24	198,1	2,97	142,2	4,73
31	197,9	0,65	136,1	0,60
63	196,3	3,87	125,8	3,34
69	193,8	2,00	114,4	2,74
84	176,4	4,00	110,7	3,57
92	150,3	0,64	100,2	1,15

V tabulce 2 a grafu na obr. 19 vyplývá, že u tanku 1 došlo k nárůstu glyoxalu až po 3 dnech po zaočkování. Nejvyšší koncentrace byla naměřena 7. den, následující dny byla koncentrace stabilní a začala klesat až po 69. dni.

U vína z tanku 2 došlo k nárůstu glyoxalu první den po zaočkování, maximální hodnota dosáhla 4 den a následně nastal prudký pokles koncentrace až do 92. dne, kdy hodnota glyoxalu dosáhla menší hodnoty než původní koncentrace.

Tab. 3. Koncentrace methylglyoxalu ve vzorcích vína

Den odběru vzorku	Tank 1		Tank 2	
	\bar{c} [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	SD	\bar{c} [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	SD
-1	26,0	0,66	26,3	0,07
0	26,3	0,65	26,4	0,17
1	23,8	0,79	26,8	0,05
2	20,0	0,01	34,8	0,31
3	18,7	0,20	36,2	0,14
4	17,5	0,45	37,9	0,38
6	16,2	0,28	37,4	0,19
7	15,7	0,24	37,3	0,07
14	14,8	0,12	36,9	0,39
24	15,0	0,28	35,3	0,47
31	14,7	0,05	33,0	0,09
63	12,2	0,20	32,3	0,43
69	9,8	0,19	30,9	0,19
84	6,1	0,19	30,7	0,03
92	1,0	0,03	30,2	0,08

V tabulce 3 a grafu na obr. 20 vyplývá, že u tanku 1 došlo k poklesu koncentrace methylglyoxalu po zaočkování. K prudšímu poklesu došlo po 31. dni. Koncentrace glyoxalu dosáhla skoro nulové hodnoty v 92. dni než původní koncentrace.

U tanku 2 došlo naopak k nárůstu methylglyoxalu po zaočkování, maximální hodnota dosáhla 4. den a následně nastal mírný pokles koncentrace až do 92. dne, kdy hodnota methylglyoxalu dosáhla hodnoty o něco vyšší než původní koncentrace.

Tab. 4. Koncentrace pentan-2,3-dionu ve vzorcích vína

Den odběru vzorku	Tank 1		Tank 2	
	\bar{c} [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	SD	\bar{c} [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	SD
-1	6,0	0,04	5,9	0,10
0	6,1	0,10	6,4	0,18
1	19,4	0,10	13,0	0,18
2	20,4	0,47	16,3	0,45
3	19,6	0,54	17,8	0,35
4	17,2	0,28	18,5	0,27
6	15,8	0,03	19,8	0,45
7	13,6	0,10	19,5	0,37
14	10,1	0,04	19,3	0,21
24	8,3	0,20	16,4	0,17
31	6,8	0,15	12,4	0,26
63	5,3	0,06	10,0	0,29
69	4,8	0,06	5,6	0,03
84	3,1	0,06	4,5	0,11
92	1,5	0,03	2,0	0,04

V tabulce 4 a grafu na obr. 21 vyplývá, že u tanku 1 došlo k prudkému nárůstu a dokonce až trojnásobku původní koncentrace pentan-2,3-dionu 2. den po zaočkování. Poté pozvolna klesala až do zhruba čtvrtiny původní koncentrace.

U tanku 2 došlo k nárůstu pentan-2,3-dionu po zaočkování, maximální hodnota dosáhla 6. den a následně nastal pokles koncentrace až do 92. dne, kdy hodnota pentan-2,3-dionu dosáhla třetinové hodnoty než původní koncentrace.

Ve vínech u tanku 1 se pohybuje koncentrace diacetylu v rozmezí 70,0 až 156,6 $\mu\text{g}/\text{l}$, methylglyoxalu v rozmezí 1,0 až 26,3 $\mu\text{g}/\text{l}$, glyoxalu v rozmezí 118,4 až 202,4 $\mu\text{g}/\text{l}$, pentan-2,3-dionu v rozmezí 1,5 až 20,4 $\mu\text{g}/\text{l}$.

Ve vínech u tanku 2 se pohybuje koncentrace diacetylu v rozmezí 83,7 až 276,7 $\mu\text{g}/\text{l}$, methylglyoxalu v rozmezí 26,3 až 37,9 $\mu\text{g}/\text{l}$, glyoxalu v rozmezí 100,2 až 209,4 $\mu\text{g}/\text{l}$, pentan-2,3-dionu v rozmezí 2,0 až 19,8 $\mu\text{g}/\text{l}$.

Celkově lze říct, že v daném časovém intervalu u vína v tanku 1 koncentrace diacetylu roste a methylglyoxalu klesá oproti původní koncentraci. Koncentrace pentan-2,3-dionu byla ze stanovených dikarboxylových sloučenin u tanku 1 i u tanku 2 ovlivněna nejméně a to pouze první dny po zaočkování. Podle naměřených koncentrací lze říct, že víno v tanku 1 je bohatší na glyoxal než víno v tanku 2.

Jedním z ovlivňujících faktorů je pH, kdy je žádoucí udržovat hodnotu přibližně v rozmezí 3,3 – 3,5, protože při této hodnotě se mohou množit bakterie *Oenococcus oeni*. Obecně lze říct, že čím nižší je kyselost vína před zaočkováním kultur, tím menší je riziko vytvoření nežádoucích produktů, které mohou negativně ovlivnit výslednou chuť a aroma vína.

Teplotní optimum u *Oenococcus oeni* je v rozmezí 20 -22 °C. Při nižší teplotě než 15°C je téměř neaktivní.

ZÁVĚR

V diplomové práci bylo cílem stanovit diacetyl, methylglyoxal, glyoxal a pentan-2,3-dion ve víně pomocí metody HPLC-UV po derivatizaci s 2,3-diaminobenzenem. V teoretické části popsat chemické složení vína, dikarboxylové sloučeniny, které jsou přítomny ve víně, a dále uvést způsoby, kterými se dají dikarboxylové sloučeniny stanovit.

Analyzovaným materiálem bylo červené víno vyrobeno z odrůdy Frankovka. Víno pocházelo ze sklizně 2008 z vinařské oblasti Morava. Byly použity vzorky, které po ukončení hlavního kvašení byly stočeny do dvou tanků. Následně byl tank 1 zaočkován preparátem pro řízenou malolaktickou fermentaci (MLF) Lalvin 31, jedná se o nově selektovaný kmen malolaktických bakterií vyšlechtěný ve Francii. Bakterie výrazně snižují riziko infekce a i v obtížných podmínkách se vyznačují obrovskou schopností přizpůsobení se prostředí. Tank 2 byl zaočkován preparátem BioStar Vitale SK11, jedná se o vysoce koncentrovanou startovací kulturu pro přímé spuštění jablečno-mléčné fermentace v červeném a bílém víně. Oba preparáty obsahovaly bakterie *Oenococcus oeni*. V obou tancích byla zajištěna optimální teplota pro správný průběh MLF, byl hlídán obsah oxidu siřičitého a pH (hodnota pH nad 3.0, volný oxid siřičitý méně než 15 mg.l⁻¹ a teplota nad 16 °C). Z každého tanku bylo provedeno celkově 15 odběrů v průběhu 93dní následujícím způsobem (den -1 (před inokulací), 0 (inokulace), 1, 2, 3, 4, 6, 7, 14, 24, 31, 63, 69, 84, 92).

Hlavní úlohou diacetylu je zlepšovat senzoričnou jakost potravin. Je to sloučenina zodpovědná za charakteristické máslové aroma a chuť, která se běžně vyskytuje ve vínech v nízkých koncentracích (1 až 4 mg/l). Jeho obsah však může být ovlivněn různými faktory (odrůdou vína, obsahem SO₂ a kyseliny citronové atd.). Ve vysokých koncentracích (5 a více mg/l) se tvoří intenzivní máslová vůně, která zásadně ovlivňuje chuť a vůni samotného vína.

Pro stanovení dikarboxylových sloučenin, je nejvhodnější metoda založená na reakci s diaminobenzenem za vzniku chinoxalinových derivátů. Chinoxalinové deriváty byly detekovány pomocí HPLC s UV detekcí. Metoda je vhodná zejména pro stanovení glyoxalu, methylglyoxalu, diacetylu a pentandionu. Metoda je velmi spolehlivá, citlivá, selektivní a má dobrou opakovatelnost.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Narižení Rady (ES) č. 491/2009 ze dne 25. května 2009, kterým se mění narižení (ES) č. 1234/2007, kterým se stanoví společná organizace zemědělských trhů a zvláštní ustanovení pro některé zemědělské produkty (jednotné narižení o společné organizaci trhů)* [online]. [cit. 2013-26-4]. Dostupné na WWW: <http://register.consilium.europa.eu/pdf/cs/10/st17/st17677.cs10.pdf>
- [2] JACKSON, Ronald S., *Wine Science: Principles and Applications*. Third Edition. Academic Press, 2008, 751 s. ISBN: 978-0-12-373646-8.
- [3] RICHTER, J. *Léčení vínem – Dobré víno náš nejlepší lék*. Bratislava: Eko-konzult, 2002. 168 s. ISBN 80-89044-35-2.
- [4] KRAUS, V. a kol. *Encyklopedie českého a moravského vína 2. díl*. Praha: Mystica, 2008. 311 s. ISBN 978-80-86-767-09-3.
- [5] JACKSON, R. S. *Wine science: principles, practice, perception*. Vyd. 2. London: Academic, 2000. ISBN 978-0-12-379062-0.
- [6] STEVENSON, Tom. *Světová encyklopedie vína*. Czech edition by Gemini Limited, Bratislava; redaktorka Alena Jakoubková; překlad dr. Josef Drozd, ing. Dorota Pospíšilová, CSc., ing. Karel Průša, CSc.; graficky upravil Maroš Šeršeň. 3. přeprac. vyd. Praha: Knižní klub v edici Balios, 2001. 502 s. ISBN 80-242-0619-6.
- [7] ŠVEJCAR, V., MINÁRIK, E. *Vinařství Biochemie vína*. 1 vyd. Brno: Vysoká škola zemědělská, 1976. 77 s.
- [8] KUTTELVAŠER, Z. *Abeceda vína*. Brno: Radix, 2003. 279 s. ISBN 80-8631-43-8.
- [9] *Víno jako lék – látkové složení vína* [online]. [cit. 2012-25-2]. Dostupné na WWW: http://www.vinoazdravi.cz/index.php?soubor=latkove_slozeni_vina.
- [10] KOHOUT, František. *O víně*. Redaktorka Ing. Zuzana Buderová. 2. dopl. vyd. Praha: Merkur, 1986. 265 s. ISBN 51-573-86.
- [11] JACKISCH, P. *Modern Winemaking*. Cornell University Press, 1985. 289 s. ISBN: 9780801414558.
- [12] STEIDL, R. *Sklepní hospodářství*. Valtice: Národní salon vín, 2002. 307 s. ISBN 80-903201-0-4.

- [13] FIALKOVÁ, B. *Enologie a odborná degustace*. Praha: 2007. 140 s. ISBN 978-8086-578-70-5.
- [14] PAVLOUŠEK, P. *Výroba vína u malovinařů*, Grada Publishing, Praha, 2006. ISBN 80-247-1247-4.
- [15] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 1*. Tábor: Osis, 1999. ISBN 80-902391-2-9.
- [16] FISCHER, Christina. *Vína lexikon. 2*, vydání. Čestlice: Rebo Production CZ, 2007. 294 s. ISBN 978-80-7234-859-6.
- [17] *Kyselina vinná* [online]. [cit. 2013-4-30]. Dostupné na WWW: <http://www.dtest.cz/ecka/158/kyselina-vinna>.
- [18] PEČOVÁ, D.: *Organická chemie*, Nakladatelství Olomouc, Olomouc, 2002, 128 s. ISBN 80-7182-142-X.
- [19] *Kyselina jablečná* [online]. [cit. 2013-4-30]. Dostupné na WWW: <http://44291.us.all.biz/cs/kyselina-jablecna-gg1090617>.
- [20] FELDKAMP, H.: *Domácí výroba vína*, Víkend, Vimperk, 2003, 128 s. ISBN 80-7222-267-8.
- [21] *Kyselina mléčná* [online]. [cit. 2013-4-30]. Dostupné na WWW: http://www.mojechemie.cz/Organick%C3%A1_Chemie:Karboxylov%C3%A9_kyseliny_a_jejich_deriv%C3%A1ty#Kyselina_ml.C3.A9.C4.8Dn.C3.A1.
- [22] *Kyselina octová* [online]. [cit. 2013-4-30]. Dostupné na WWW: http://sk.wikipedia.org/wiki/Kyselina_octov%C3%A1.
- [23] *Kyselina citronová* [online]. [cit. 2013-4-30]. Dostupné na WWW: <http://projektysipvz.gytool.cz/ProjektySIPVZ/Default.aspx?uid=386>.
- [24] *Kyselina jantarová* [online]. [cit. 2013-4-30]. Dostupné na WWW: http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_jantarov%C3%A1.
- [25] DOHNAL, KRAUS, PATEK. *Moderní vinař*. Liberec: Severografia, 1975. 07-074-75.
- [26] SALFELLNER, H. *Víno a medicína*. Praha: Vitalis, 1992. 192 s. ISBN 80-901370-0-84.

- [27] SOUFLEROS, E. H., et al. *Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage. Food Chemistry.* 2003, Vol. 80, Issue 2, s. 261-273. ISSN 03088146.
- [28] Farkaš, J., *Technológia a biochémia vína*, Alfa, Bratislava, 1973.
- [29] *Fruktoza, glukóza* [online]. [cit. 2012-3-7]. Dostupné na WWW: <http://ebiolog.pl/a-3-6.html>.
- [30] HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L. *Vitamíny*. Praha: Grada, 2004. 232 s. ISBN 80-247 0373-4.
- [31] KOTLÍK, B., RŮŽIČKOVÁ, K., *Chemie v kostce 1.díl.*, 1.vyd. Havlíčkův Brod, Fragment, 1997. ISBN 80-7200-057-8.
- [32] *Karbonylové sloučeniny* [online]. [cit. 2012-17-8]. Dostupné na WWW: http://cs.wikipedia.org/wiki/Karbonylov%C3%A9_slou%C4%8Deniny.
- [33] 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.
- [34] MAREČEK, A., HONZA, J., *Chemie.*, 1.vyd. Nakladatelství Olomouc, 2000. ISBN 80-7182-057-1.
- [35] MORENO-ARRIBAS, M., POLO, M. *Wine chemistry and biochemistry*. New York: Springer, 2009. 735 pp. ISBN 978-0-387-74118-5.
- [36] *Vinařský slovník* [online]. [cit. 2012-12-8]. Dostupné na WWW: <http://www.vinny-sklipek.cz/index.asp?menu=685>.
- [37] CHEN, Y., SHIREY, E., R., SIDISKY, M., L., *Determination of Diacetyl in Butter and Air Samples by SPME Coupled with GC-MS*. pp 999-1004, 2010.
- [38] PAVLOUŠEK, P. *Výroba vína u malovinařů 2., aktualizované a rozšířené vydání*, Grada Publishing, Praha, 2010. ISBN 978-80-247-3487-3.
- [39] FULGELSANG, C., K., EDWARDS, G., CH., *Wine mikrobiology- Practical Applications and procedures*. 2nd, Springer, 2007, ISBN-10: 0-387-33341-X, ISBN-13: 978-0-387-33341-0.

- [40] RIBÉREAU-GAYON, P., GLORIES, Y, MAUJEAN, A., DOUBOURUED, D. *Handbook of enology, Volume 2, The chemistry of wine, Stabilization and Treatments*. England, 2000, 451s. ISBN-13: 978-0-470-01037-2.
- [41] *Diacetyl, propan-2,3-diol* [online]. [cit. 2012-20-8]. Dostupné na WWW: <http://blogs.edf.org/nanotechnology/2010/01/12/won%E2%80%99t-we-ever-stop-playing-whack-a-mole-with-%E2%80%9Cregrettable-chemicalsubstitutions%E2%80%9D/>.
- [42] PATOČKA, J. *DIACETYL, MÁSLA A POPCORN* [online]. [cit. 2013-4-30]. Dostupné na WWW: <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=332>.
- [43] *Glyoxal, methylglyoxal* [online]. [cit. 2012-20-8]. Dostupné na WWW: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/15/Glyoxal.svg>.
- [44] LIYANAGE, H., KASHKET, S., YOUNG, M., KASHKET, R., E. *Clostridium beijerinckii and Clostridium difficile Detoxify Methylglyoxal by a Novel Mechanism Involving Glycerol Dehydrogenase*, *appl Environ Microbiol.* 2001, 67(5):2004-2010.
- [45] GILLES DE REVEL, PRIPIS- NICOLAU, L., BARBE, J., CH., BERTRAND, A., *The detection of α -dicarbonyl compounds in wine by formation of quinoxaline derivatives*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 102-108, 2000.
- [46] DAGLIA, M., PAPETTI, A., GRISOLI, P., ACETI, C., SPINI, V., DECARRO, C., GAZZANI, G., *Isolation, Identification, and Quantification of Roasted Coffee antibacterial Compounds*. *J. Agric. Food chem.*, 2007, 55, 10208-10213.
- [47] *Gravimetrie* [online]. [cit. 2013-4-30]. Dostupné na WWW: <http://web.vscht.cz/koplikr/%C4%8C%C3%A1st%20A3.pdf>.
- [48] KŘÍŽENECKÁ, S. *Základy analytické chemie*, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně. Fakulta životního prostředí, 2007.
- [49] KLOUDA, P., *Moderní analytické metody*, 132 str., 2. vydání, ISBN 80-86369-07-2, 2003.
- [50] *Kapalinový chromatograf* [online]. [cit. 2013-4-30]. Dostupné na WWW: http://www.comsol.com/stories/waters_corp_hplc_systems/full/.

- [51] FERREIRA, REIS, S., RODRIGUES, C., OLIVEIRA, C., GUEDIES DE PINHO, P., *Simultaneous Determination of Ketoacids and Dicarbonyl Compounds, Key Maillard Intermediates on the Generation of Aged Wine Aroma*. Journal of food science, 2007.
- [52] ARRIBAS-LORENZO, G., MORALES, J., F., *Analysis, Distribution, and Dietary Exposure of Glyoxal and Methylglyoxal in Cookies and Their Relationship with Other Heat-Induced Contaminant*. J. Agric. Food Chem. 2010, 58, 2966-2972.
- [53] *Lalvin 31* [online]. [cit. 2013-20-4]. Dostupné na WWW: <http://vino.eshop12.cz/kategorie/21-lalvin-31-mbr>.
- [54] *Biostart vitale SK11* [online]. [cit. 2013-20-4]. Dostupné na WWW: <http://www.vinarskyraj.cz/detail/biostart-vitale-sk11-0-140-kg-na-5000-1/>.
- [55] BARTOWSKY, J., E., BORNEMAN R., J., *Genomic variations of Oenococcus oeni strains and the potencial to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine*. Appl microbiol Biotechnol, 2011, 92:441-447.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HPLC Vysokoučinná kapalinová chromatografie

UV Ultrafialové spektrum

MGO methylglyoxal

GO glyoxal

FID plamenově ionizační detektor

VIS viditelné spektrum

SD směrodatná odchylka

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Vzorec α -D-fruktózy, α -D-glukózy	14
Obr. 2. Vzorec sacharózy	14
Obr. 3. Vzorec kyseliny vinné	15
Obr. 4. Vzorec kyseliny jablečné	16
Obr. 5. Vzorec kyseliny mléčné	16
Obr. 6. Vzorec kyseliny octové	17
Obr. 7. Vzorec kyseliny citronové.....	17
Obr. 8. Vzorec kyseliny jantarové	17
Obr. 9. Vzorec karbonylové skupiny	26
Obr. 10. Vzorec ketonu.....	26
Obr. 11. Vzorec aldehydu	27
Obr. 12. Vzorec diacetylu.....	28
Obr. 13. Vzorec pentan-2,3-dionu	29
Obr. 14. Vzorec glyoxalu	29
Obr. 15. Vzorec methylglyoxalu	30
Obr. 16. Schéma kapalinového chromatografu	33
Obr. 17. Grafická Schéma plynového chromatografu	35
Obr. 18. Graf koncentrace diacetylu ve víně	57
Obr. 19. Graf koncentrace glyoxalu ve víně	58
Obr. 20. Graf koncentrace methylglyoxalu ve víně	59
Obr. 21. Graf koncentrace pentan-2,3-dionu ve víně	60

SEZNAM TABULEK

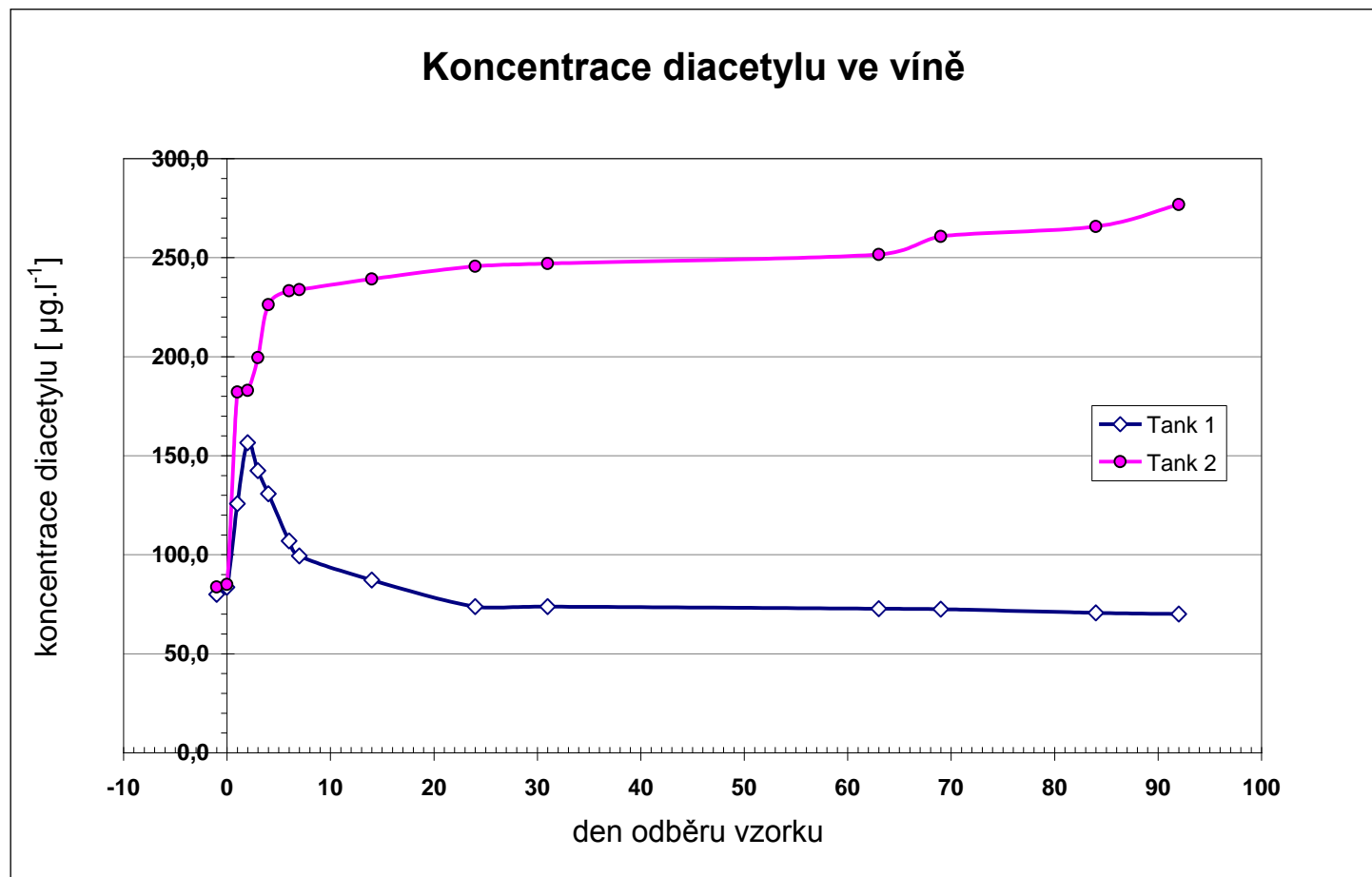
Tab. 1. Koncentrace diacetylu ve vzorcích vína	42
Tab. 2. Koncentrace glyoxalu ve vzorcích vína	43
Tab. 3. Koncentrace methylglyoxalu ve vzorcích vína	45
Tab. 4. Koncentrace pentandionu ve vzorcích vína	46

SEZNAM PŘÍLOH

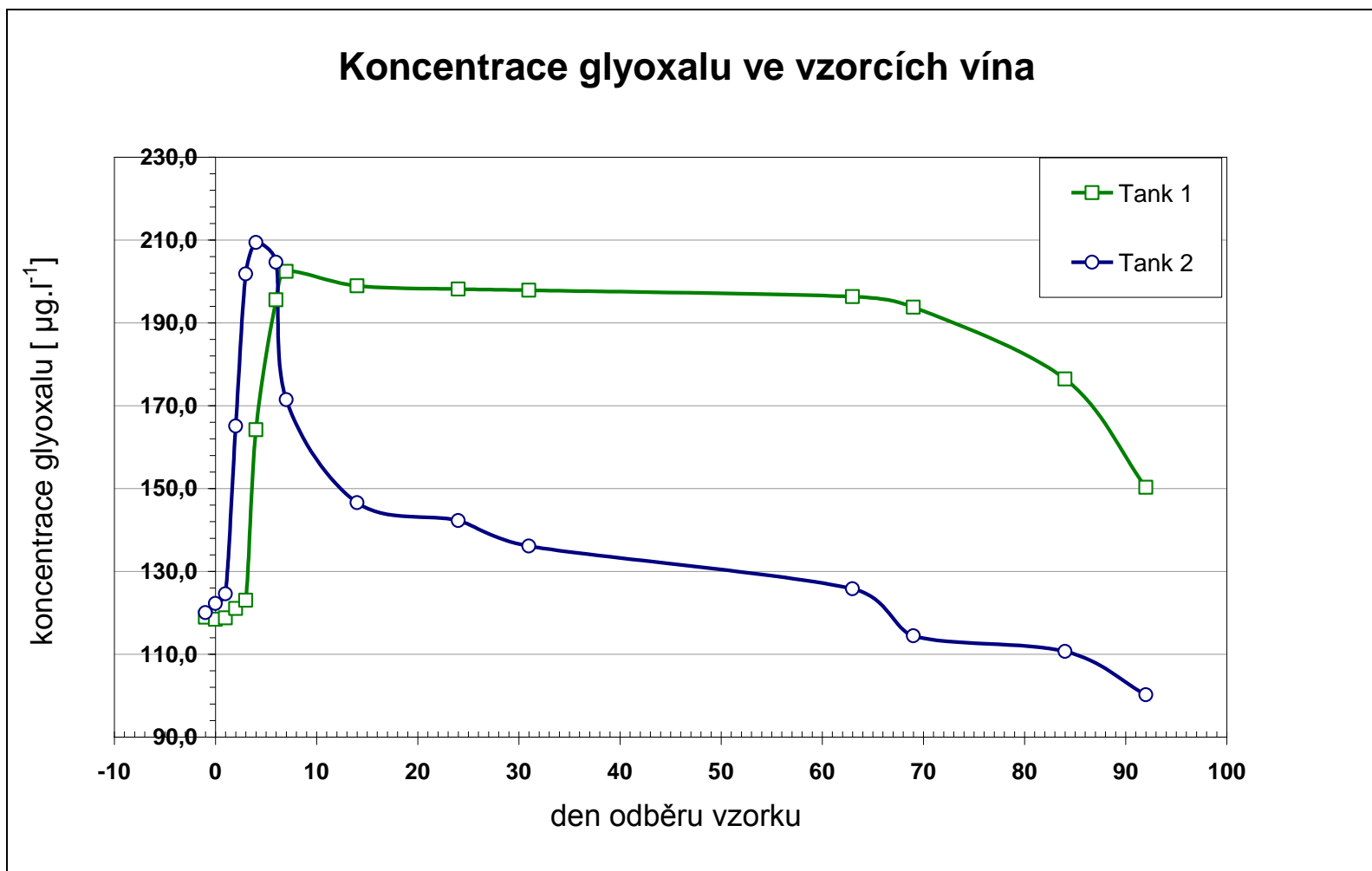
P I Koncentrace dikarboonylových sloučenin ve vzorcích vína

PŘÍLOHA P I: KONCENTRACE DIKARBONYLOVÝCH SLOUČENIN VE VZORCÍCH VÍNA

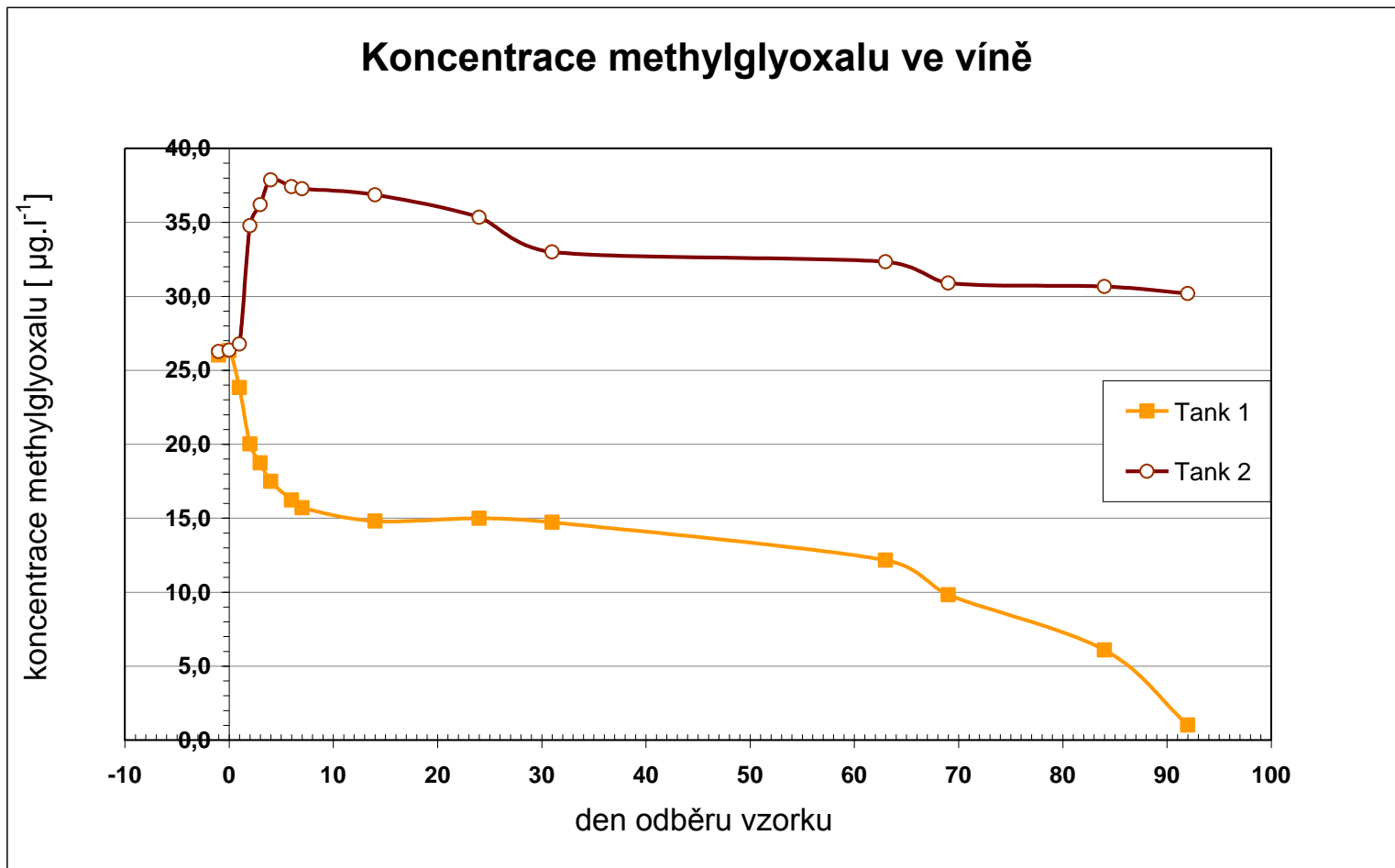
Obr. 18. Graf koncentrace diacetylu ve víně



Obr. 19. Graf koncentrace glyoxalu ve víně



Obr. 20. Graf koncentrace methylglyoxalu ve víně



Obr. 21. Graf koncentrace pentan-2,3-dionu ve víně

