

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**Bc. Tereza Vacková**

**Biochemické změny během stárnutí červeného vína**

**Biochemical changes accompanying the aging of red wine**

**Diplomová práce**

Vedoucí práce: **prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.**

Praha 2013

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 22.8. 2013

Podpis:

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji panu Prof. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc. za vedení práce, za odborné náměty, rady a připomínky.

Dále děkuji panu Prof. RNDr. Gustavu Entlicherovi, CSc. a panu Prof. Ing. Jiřímu G. K. Ševčíkovi, DrSc. za poskytnuté vzorky červených vín.

## **Obsah**

1.	Seznam použitých zkratek.....	6
2.	Abstrakt.....	7
3.	Abstract.....	8
4.	Přehled literatury.....	9
4.1.	Morfologie a chemické složení hroznů.....	9
4.1.1.	Složení slupky a dužiny.....	9
4.1.2.	Složení semen a třapin.....	10
4.2.	Výroba vína.....	10
4.3.	Rostlinné fenolické sloučeniny – flavonoidy.....	12
4.3.1.	Flavanoly (flavan-3-oly).....	16
4.3.2.	Anthokyany.....	20
4.3.3.	Chemické reakce probíhající ve víně.....	21
4.3.4.	Biosyntéza flavonoidů.....	25
5.	Cíle práce.....	29
6.	Experimentální část.....	30
6.1.	Chemikálie a roztoky.....	30
6.2.	Přístroje.....	31
6.3.	Metody.....	32
6.3.1.	Metoda RP-HPLC ke stanovení malvidin-3-glukosidu.....	32
6.3.2.	Metoda CieLab ke stanovení chromatických charakteristik ve víně.....	33
6.3.3.	Stanovení barevné hustoty a odstínu.....	34

6.3.4.	Stanovení kopigmentujících, monomerních, polymerních a celkových anthokyanů.....	34
6.3.5.	Stanovení anthokyanů a celkových fenolických látek.....	35
6.3.6.	Stanovení antioxidační aktivity.....	36
7.	Výsledky.....	37
7.1.	Změny barvy během stárnutí.....	37
7.1.1.	Metoda CieLab.....	37
7.1.2.	Stanovení barevné hustoty a odstínu.....	40
7.2.	Změny v koncentracích anthokyanů a dalších fenolických látek ovlivňující barvu vína během stárnutí.....	42
7.2.1.	Koncentrace malvidin-3-glukosidu ve víně.....	42
7.2.2.	Koncentrace celkových anthokyanů ve víně pomocí příslušných modifikovaných metod.....	47
7.2.3.	Stanovení koncentrace celkových fenolických látek.....	49
7.2.4.	Stanovení antioxidační aktivity.....	50
7.2.5.	Stanovení kopigmentujících, monomerních, polymerních a celkových anthokyanů.....	53
8.	Diskuse.....	60
8.1.	Svatovavřínecké víno, ročník 2010.....	60
8.2.	Svatovavřínecké víno, ročník 2012.....	61
8.3.	Nesířené víno.....	62
9.	Závěr.....	64
10.	Seznam použité literatury.....	65

## **1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

ACN	acetonitril
CIE	Mezinárodní komise pro osvětlování
FAL	fenylalaninamoniumlyasa
HPLC-RP	vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
mv-3-glc	malvidin-3-glukosid
MF	mobilní fáze
NV	nesířené víno
OIV	Mezinárodní organizace pro révu a vínu
ROS	reactive oxygen species – reaktivní formy kyslíku
SV10	Svatovavřínecké víno, ročník 2010
SV12	Svatovavřínecké víno, ročník 2012
TAL	tyrosinamoniumlyasa

## **2. ABSTRAKT**

Flavonoidy jsou rostlinné sekundární metabolity, které se dělí do několika skupin podle chemické struktury. Důležitými složkami vína, které jsou zodpovědné za jeho barvu, chuť a další sensorické vlastnosti, jsou barevné pigmenty - anthokyany a taniny (třísloviny). Koncentrace anthokyanů ve víně je ovlivněna odrůdou, zpracováním hroznů a klimatickými podmínkami.

Ke studiu změny barvy a tím i souvisejícího chemického složení, byly použity tři nekomerční vzorky červeného vína, Svatovavřínecké, ročník 2010 a 2012, a domácí víno bez přidaného SO<sub>2</sub>. Ke stanovení barevných změn byly použity převážně kolorimetrické (metoda CieLab) a zjednodušené spektrofotometrické metody (barevná hustota a odstín). Množství anthokyanů bylo sledováno analytickou metodou RP-HPLC. Koncentrace fenolických látek byla stanovena upravenými enologickými metodami.

Během stárnutí vína došlo k barevným změnám, které byly způsobeny polymerizačními reakcemi, které probíhají mezi anthokyany a fenolickými sloučeninami. To vedlo ke vzniku stabilních barevných pigmentů, které se projeví vyšším absorpčním maximem a tedy i tmavším zbarvením.

**Klíčová slova:** anthokyany, barva, červené víno, fenolické sloučeniny, malvidin-3-glukosid, polymerizační reakce, pigmenty.

### **3. ABSTRACT**

Flavonoids are plant secondary metabolites, which belong to several groups varying in their chemical structure. Anthocyanins and tannins are important flavonoid components of wine that are responsible for its color, taste and other sensory properties. The concentration of anthocyanins in wine is affected by grape variety, processing technology, and climatic conditions.

In this Thesis, we studied the changes in color and in related chemical composition, using three non-commercial samples of red wine: Svatovavřinecké (year 2010 and 2012), and home-made wine (prepared without addition of SO<sub>2</sub>). These changes in color were determined using standard colorimetric method (CIELab) and also a simplified two-parametric spectrophotometric method (tint/color density). The content of anthocyanins was followed using analytical RP-HPLC method. In parallel, simplified oenologic methods for estimation of phenolic compounds were used.

Generally the wine samples changed color to darker tint. Chemically, this was caused by polymerisation reactions between anthocyanins and phenolic compounds. This led to the formation of stable pigments characterised by a higher absorption maximum at longer wavelength, hence a darker tint.

**Key words:** anthocyanins, color, red wine, phenolic compounds, malvidin-3-glucosid, polymeric reactions, pigments.



## **4. PŘEHLED LITERATURY**

Víno je známo už několik tisíc let. První důkazy o pěstování vinné révy pocházejí z Iránu, Afghánistánu a z Číny. Odtud bylo rozšířeno do dalších zemí [1].

Dnes je víno nejen oblíbeným alkoholickým nápojem, ale pro vědce z celého světa je i velmi zajímavým předmětem studia. Je to dáno tím, že jsou v něm obsaženy chemické sloučeniny, které mají pozitivní vliv na lidské zdraví. Kromě toho ve víně probíhají různé chemické procesy, které se mohou lišit u jednotlivých odrůd v závislosti na klimatických podmínkách, které ovlivňují chemické složení hroznů vinné révy.

V této diplomové práci navazuji na bakalářskou práci, ve které jsem se zabývala obecněji chemickými sloučeninami obsaženými ve víně, a jejich změnami během stárnutí. V této práci se zaměřuji zejména na barvu červeného vína a na chemické látky, které ji ovlivňují.

### **4.1. Morfologie a chemické složení hroznů**

Hrozny vinné révy se skládají z bobulí a třapin. Bobule je tvořena vrstvou slupky, dužinou a pecičkami. V jednotlivých částech bobulí a třapin je rozdílné zastoupení chemických sloučenin v závislosti na odrůdě daného vína a klimatických podmínkách [1], [2], [3].

#### **4.1.1. Složení slupky a dužiny**

Slupka je kryta vrstvou vosku, který chrání bobuli před nadměrným odpařováním vody a před vnějšími vlivy, jako jsou například nežádoucí mikroorganismy.

Základem struktury je celulóza. Dalšími složkami obsaženými ve slupce, jsou třísloviny a barviva. Třísloviny, stejně jako barviva, jsou fenolické látky, které

dodávají vínu typickou trpkou chutí a přispívají k jeho barvě [1], [5]. Více o barvě a barevných pigmentech v odstavci 4.3.2.

Většinu hmotnosti bobule tvoří dužina. Jsou v ní obsaženy cukry (především glukosa a fruktosa), kyseliny (zejména kyselina jablečná a vinná) a v menší míře se zde vyskytují i minerální látky a vitaminy [1], [5].

#### **4.1.2. Složení semen a třapin**

Semena se liší velikostí, tvarem i barvou v závislosti na typu odrůdy. Hlavními chemickými složkami obsaženými v pečičkách jsou bílkoviny, celulóza, minerální látky a tuky. Kromě zmíněných látek jsou zde přítomny i třísloviny, které výrazně ovlivňují chuť vína [1], [2], [4].

Třapiny jsou na začátku doby zrání zelené. V průběhu dozrávání hnědnou a dřevnatí. Při špatném zpracování hroznů obsahujících zelené třapiny dochází k uvolňování tříslovin do moštu a poté do vína, vzniká tak nepříjemná, nahořklá chuť, tzv. chuť po třapinách. Pro konečné víno jsou z hlediska sensorických vlastností výhodnější hnědé třapiny, které dodávají budoucímu vínu příjemnou natrpklou příchutí [1], [4].

#### **4.2. Výroba vína**

Výrobu vína můžeme rozdělit do dvou procesů. Jedním z nich je výroba moštu a druhým samotná výroba vína.

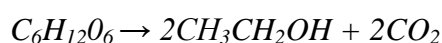
Mošt získáme po oddělení třapin od bobulí a následném rozemletí bobulí. Takto zpracovaným hroznům se říká rmut. Po získání rmutu dochází k lisování, tj. k oddělení tekuté části (moštu) od pevné (matoliny). Mošt je dále zpracováván na víno [3].

U červených, modrých a některých bílých odrůd, většinou aromatických, dochází před lisováním k tzv. nakvášení rmutu. Jde o chemický proces, při kterém se do moštu ze slupky bobulí extrahují barevné pigmenty a třísloviny. V závislosti na

délce trvání nakvácení získáme bílé, růžové nebo červené víno. Během nakvácení dochází k uvolňování  $\text{CO}_2$  [1], [6], [3].

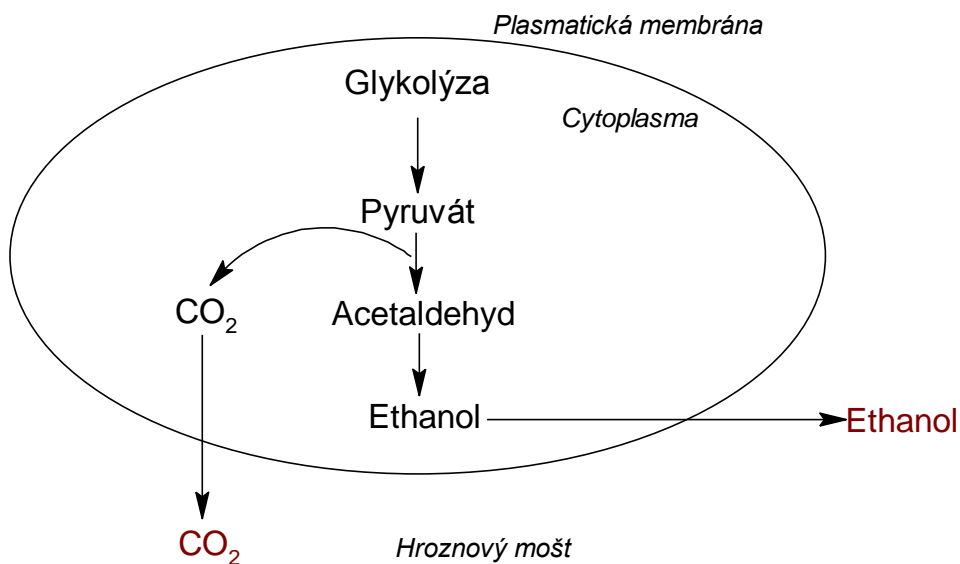
Kvasný proces se skládá ze dvou částí. První je bouřlivé kvašení, kdy se získá nejvíce alkoholu a druhou je dokvácení. Kvašení je chemický proces, ke kterému dochází bez přístupu vzduchu, jde tedy o anaerobní fermentaci [1], [6], [7].

Anaerobní neboli alkoholová fermentace (obr. 1, 2) je nejdůležitější proces výroby vína. Dochází zde k přeměně sacharidů, glukosy a fruktosy, na ethanol a  $\text{CO}_2$ . Tento proces lze shrnout následující rovnicí:



Obr. 1 : Rovnice fermentace

Alkoholové kvašení závisí nejen na množství cukrů, ale i na přítomnosti kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které řídí přeměnu pyruvátu na ethanol. Kromě těchto kvasinek se dále hojně používají i kvasinky *Saccharomyces bayanus*. Vzniklé produkty jsou transportovány jednoduchou difusí ven z buňky [7], [8].



Obr. 2 : Alkoholová fermentace

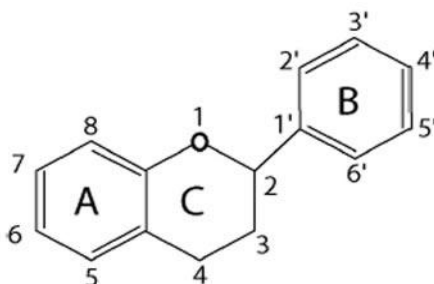
Po kvašení vína dochází ke zrání, které trvá několik měsíců, a poté následuje filtrace, kterou se odstraňují nežádoucí bílkovinné zákaly. Nakonec je víno stáčeno do lahví a putuje k prodeji [1], [6].

Způsob zpracování hroznů a celkový proces výroby vína má vliv na zastoupení složek vína, a tím i na jeho konečné sensorické vlastnosti, které se odvíjejí od celkového množství flavonoidů.

#### 4.3. Rostlinné fenolické sloučeniny - flavonoidy

Flavonoidy jsou sekundární rostlinné metabolity vyskytující se v cévnatých rostlinách, v ovoci, zelenině a v některých druzích mechů. Zřídka byly detekovány v houbách, zatímco v řasách a bakteriích se nevyskytují vůbec [9], [10].

Existuje asi 4000 známých flavonoidů s rozdílnými fyziologickými funkcemi. Z chemického hlediska jde o skupinu látek, jejíž základní stavební jednotkou je flavanový skelet (obr. 3), který je tvořen dvěma aromatickými kruhy A, B a heterocyklem s kyslíkem [9], [11], [13].



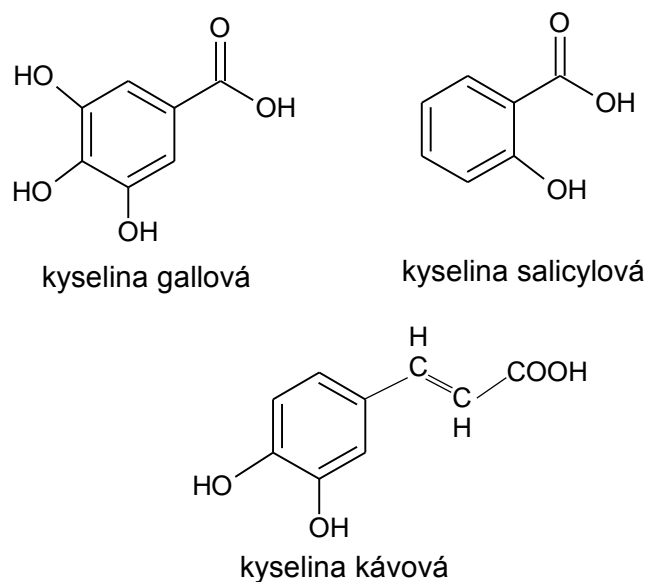
Obr. 3 : Flavanový skelet [2]

Z vlastností flavonoidů, které jsou rozmanité, vychází i jejich funkce. Slouží jako atraktanty pro opylení a rozptyl semen díky různým barvám květů a plodin. Díky chromoforu, který je součástí základní struktury, absorbují flavonoidy UV a VIS světlo a tím chrání rostliny před nebezpečným UV zářením. Dále působí jako odrazující prostředek před býložravci, díky hořké a svírající trpké chuti flavan-3-olů a kondenzovaných taninů. Mnohé flavonoidy a isoflavonoidy využívají fytoalexinovou aktivitu. (Fytoalexin slouží jako obrana při napadení houbovými či bakteriálními patogeny.) Kromě těchto zmíněných vlastností má řada těchto sloučenin antioxidační aktivitu [9].

Jako antioxidanty mohou flavonoidy chránit tkáň lidského těla. Potlačují ROS a tím snižují riziko infarktu. Díky chemické struktuře, fenolickému charakteru, se chovají jako chelátory kovů a deaktivátory volných radikálů. Potlačují také peroxidaci lipidů. Inhibují aktivitu některých enzymů, např. cyklooxygenasy, lipoxygenasy aj. [12].

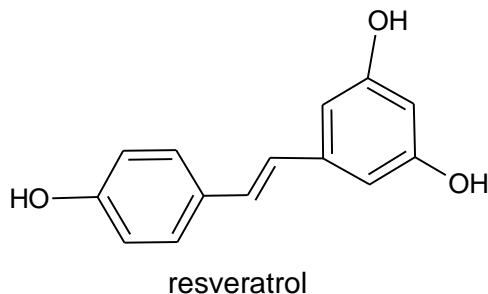
Flavonoidy tvoří komplexy s dalšími fenolickými látkami, s ionty kovů a dalšími molekulami, jako je například acetaldehyd či SO<sub>2</sub>. Vznikají tak nové deriváty s rozdílnými vlastnostmi. Podrobněji budou některé z těchto reakcí probrány v odstavci 4.3.3. [3], [11].

V rostlinách jsou flavonoidy nejčastěji vázány glykosidovou vazbou v poloze C3. Cukernou složkou bývá nejčastěji glukosa či rhamnosa, která je často acylována na uhlíku C6 dalšími fenolickými látkami a to kyselinou benzoovou, malonovou či gallovou za tvorby esterové vazby. Kromě zmíněných kyselin může docházet k esterifikaci i s kyselinou salicylovou, a s kyselinami (*o*, *m*, *p*)-kumarovou a kávovou. (Deriváty těchto kyselin jsou na obr. 4) [11], [12], [14], [15].



Obr.4 : Deriváty kyseliny benzoové a skořicové [11]

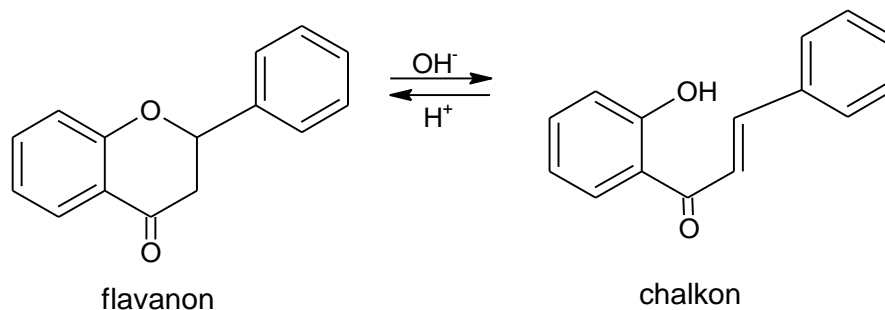
Dalšími sloučeninami vyskytujícími se v rostlinách jsou kumarin a jeho deriváty, prenylované flavonoidy nacházející se ve chmelu, a deriváty stilbenu, jehož nejznámějším derivátem je resveratrol obsažený ve slupkách bobulí vinné révy [11].



Obr. 5 : Resveratrol [15]

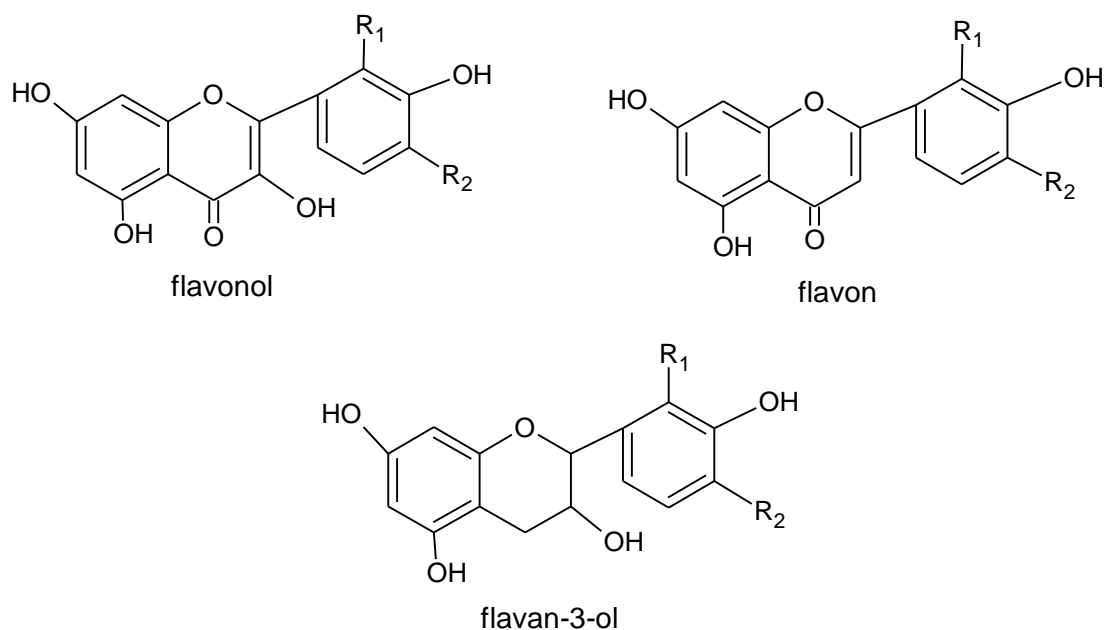
Flavonoidy jsou fenolické sloučeniny odvozené od flavanového skeletu. Do této skupiny látek patří tyto deriváty: chalkony, flavanony, flavony, flavonoly, katechiny (flavan-3-oly), flavan-3,4-dioly, anthokyanidiny. Tyto skupiny se mezi sebou liší rozdílnými substituenty na kruhu B, kterými jsou  $-H$ ,  $-OCH_3$  a  $-OH$  skupiny [11], [13], [16].

*Chalkony a flavanony.* Chalkony nepatří svojí chemickou strukturou přímo mezi flavanové deriváty, protože nemají charakteristický heterocyklický kruh. Mohou být substituovány na obou kruzích A i B (obr. 3). V kyselém prostředí přecházejí volně na flavanony (obr. 6) [7], [11]. Nejčastěji se vyskytují ve žlutých květech rostlin z čeledi *Asteraceae* [13].



Obr. 6 : Přeměna chalkonů ve flavanony podle [11]

*Flavony, flavonoly a flavanoly* (obr. 7) jsou žluté pigmenty, které se vyskytují nejen v bílém, ale i červeném víně. Flavony se nacházejí v listech révy vinné, zatímco flavonoly a flavanoly jsou obsaženy ve slupkách a dužině bobulí [13]. Tyto fenolické látky se mezi sebou liší rozdílnými pozicemi hydroxylových skupin na kruhu B v pozicích C3' a C5' na flavanovém skeletu. Kromě flavanolů, mají obě skupiny látek na heterocyklu v pozici C4 ketonovou skupinu [14], [16].



Obr. 7 : Struktury hlavních flavonoidů. R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>=H, OH, OCH<sub>3</sub> podle[14]

Tyto barevné pigmenty jsou zodpovědné za senzorické vlastnosti vína, jako je barva či jeho chuť. Množství flavanolů ovlivňuje hořkost a trpkost. Ty jsou i příčinou oxidativního hnědnutí vína, které je způsobeno vzdušným kyslíkem za katalýzy polyfenoloxidas a vzniku chinonů [14], [17].

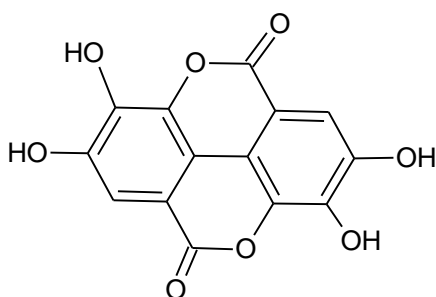
Množství flavanolů ve slupkách bobulí závisí na klimatických podmínkách a odrůdě. Vinná réva, která je vystavena více slunci, obsahuje vyšší koncentraci flavanolů, například se zvyšuje množství kemferolu a kvercetinu [9], [14]. Extrakci flavanolů a jiných flavonoidů z bobulí a tím i jejich množství v konečném červeném víně, lze zvýšit například metodou Flash release (FR), která je založena na krátkém zahřátí hroznů až nad teplotu 95°C. Zahřátí probíhá za atmosférického tlaku a zahřátý rmut je poté vystaven sníženému tlaku (10<sup>4</sup>Pa) což způsobuje okamžité vypařování

vody z bobulí. Použitím této metody a pektolytických enzymů dojde k rozbití buňky a membrán vakuol, a tím se urychlí extrakce fenolických látek a zvýší se jejich koncentrace [18].

#### **4.3.1. Flavanoly (flavan-3-oly)**

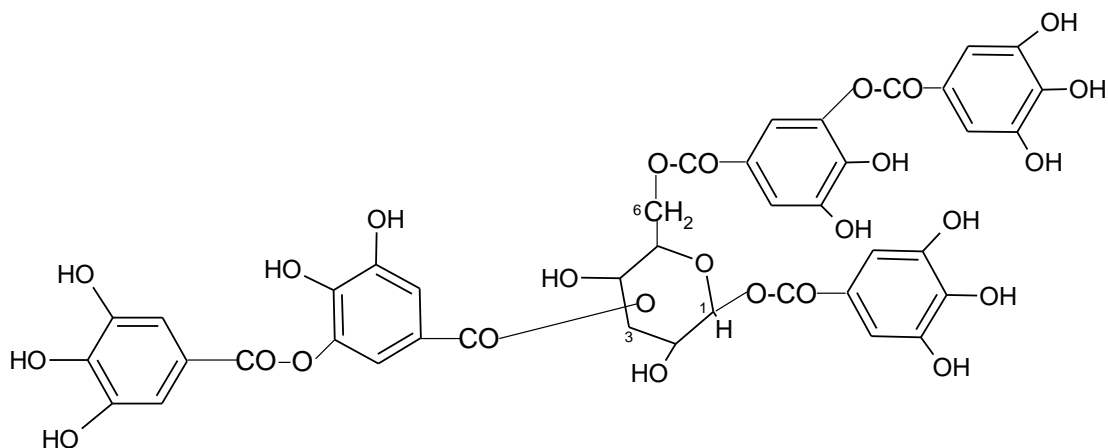
Flavanoly (přesněji flavan-3-oly) jsou také nazývány třísloviny (taniny). V hroznech jsou přítomny hlavně v semenech a ve slupkách bobulí ve formě monomerů, ale i oligomerů a polymerů. Ve víně jsou důležitou složkou, přispívají ke stabilitě barvy vína, díky své afinitě ke kyslíku zabraňují oxidaci barevných flavonoidů. Mají tedy antioxidační aktivitu. Ovlivňují také hořkost a trpkost vína [9], [14], [15].

Ve víně se nacházejí dva typy taninů, hydrolyzovatelné a kondenzované. Hydrolyzovatelné se do vína dostávají extrakcí z dubových sudů, ve kterých je víno uskladněno. Z chemického hlediska se nejedná přímo o flavonoidní sloučeniny, ale jsou to polymery (obr. 9) kyseliny gallové nebo ellagové (obr. 8) s cukry, většinou s glukosou. Tyto sloučeniny jsou dále nazývány gallotaniny či ellagotaniny [12], [14].



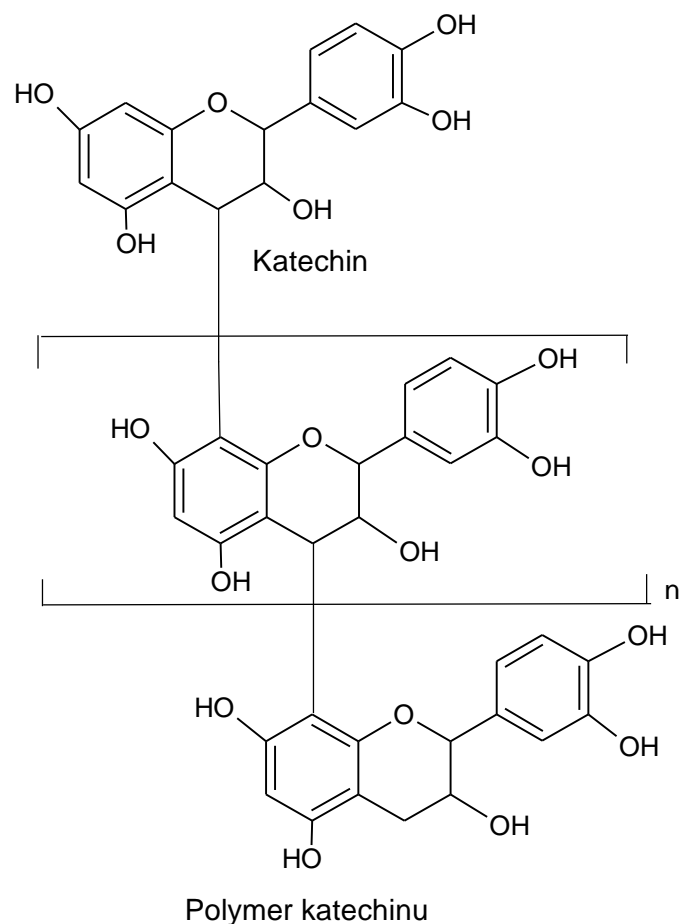
Obr. 8 : Kyselina ellagová [19]





Obr. 9 : Příklad polymerizačního produktu: 1-galloyl-3,6-digalloyl glukosa podle [14]

Nejčastějším monomerem je z flavan-3-olů katechin (obr. 10) a jeho izomer epikatechin. Dalšími monomerními deriváty jsou epigallokatechin a epikatechin gallát. Tyto sloučeniny vytváří oligomery a polymery a jsou nazývány kondenzované taniny (proanthokyanidiny, prokyanidiny) (obr. 11). Při zahřátí v kyselém prostředí dochází k uvolnění červených pigmentů anthokyanidinů, odtud název proanthokyanidiny. [9], [11], [12], [14], [20].

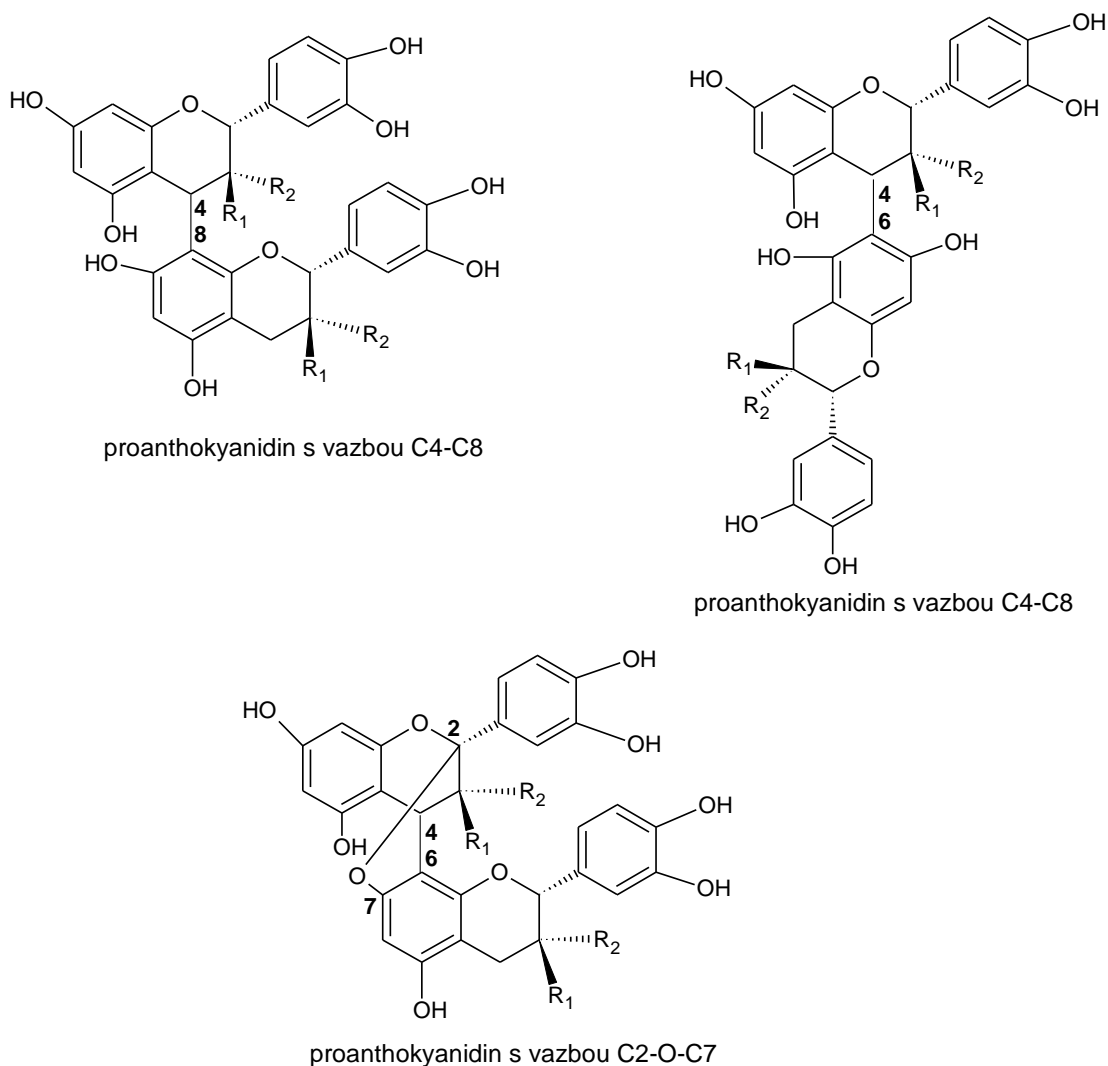


Obr. 10 : Kondenzované taniny podle [11]

Kondenzované taniny (proanthokyanidiny) jsou nejvíce zastoupenou skupinou fenolických látek ve víně, po nich následují anthokyaniny a flavonoly. Nacházejí se ve slupce a v semenech bobulí. V semenech jsou obsaženy kondenzované taniny s kratším polymerním řetězcem, který je tvořen z monomerních podjednotek katechinu a epikatechinu. Ve slupce jsou naopak proanthokyanidiny tvořeny delším řetězcem, jehož základní monomerní jednotkou je epikatechin [9]. Jejich koncentrace v hroznech je dána klimatickými podmínkami a odrůdou. Množství ve víně je dáno rovnováhou mezi množstvím extrahovatelných taninů v hroznech, extrakcí taninů z bobulí během fermentace a jejich precipitací. Extrakce je ovlivněna teplotou, dobou, obsahem alkoholu a zpracováním hroznů. Se stářím vína koncentrace taninů roste a mění se i trpkost vína [15]. Třísloviny interagují s proteiny vyskytujícími se ve slinách. Jejich vzájemná interakce způsobí v ústech pocit trpkosti. Během stárnutí ale dochází ke kondenzačním reakcím mezi

anthokyany a taniny, vznikají tak stabilnější barevné pigmenty, které ve formě kationtů snižují trpkost vína [9], [21].

Tvorba dimerů proanthokyanidinů (obr. 11) probíhá na uhlících C4-C8 nebo C4-C6. Dochází tak ke spojení dvou flavanolových jednotek. Nově vzniklý derivát (dimer) umožní další větvení sloučeniny a vytváření nových sloučenin (oligomerů). Kromě tohoto uspořádání vazeb, dochází i k vazbám na uhlících C2-O-C7 nebo C2-O-C5 [14].

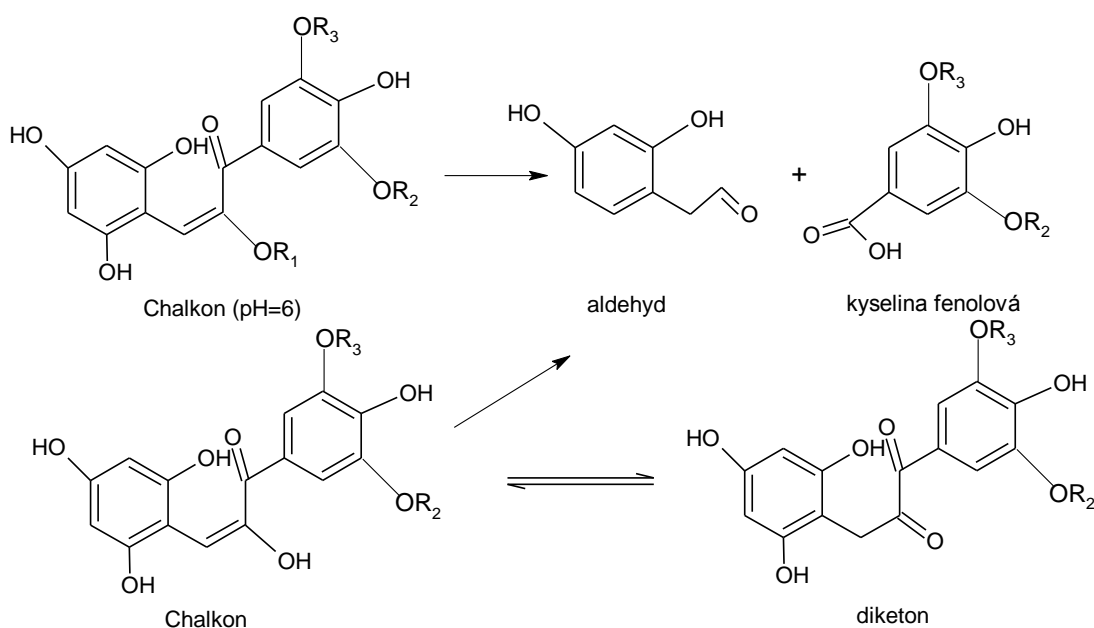


Obr. 11 : Typy vazeb u dimerů proanthokyanidinů. R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>=H, OH, O-G. Kde G je kyselina gallová podle [14].

### 4.3.2. Anthokyany

Anthokyany jsou přírodní barevné pigmenty vyskytující se ve slupce bobulí. Do vína jsou extrahovány během macerace, jejich množství je na začátku fermentace maximální a během stárnutí klesá, nejvýraznější pokles nastává několik dní po fermentaci [10], [14]. Je to způsobeno adsorpcí anthokyanů na buněčnou stěnu kvasinek, s nimiž jsou následně filtrovány. Jejich koncentrace závisí na odrůdě, klimatických podmínkách, množství a druhu kvasinek a typu půdy [22].

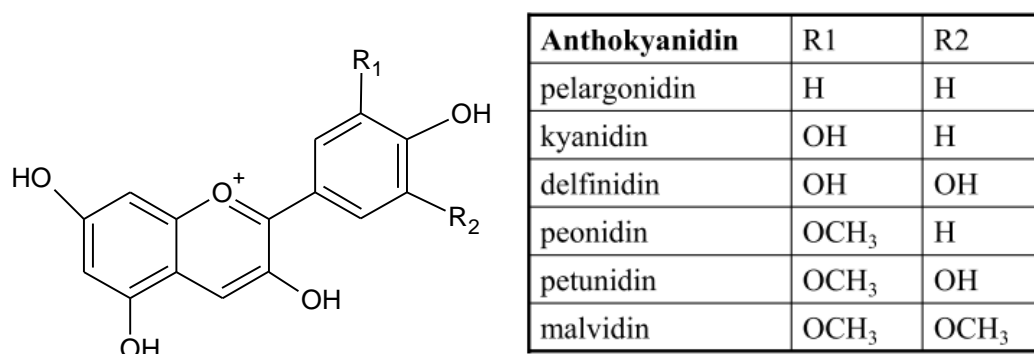
Stabilita anthokyanů závisí na hodnotě pH. Při nízkém pH jsou anthokyany ve formě flavyliového kationtu zodpovědné za červenou barvu. V chinoidní formě jsou modré a v hemiketalové nebo chalkonové jsou bezbarvé [10], [14], [15], [23]. Stabilita anthokyanidinů závisí i na substituentech vyskytujících se na kruhu B, například skupiny -OH a -OCH<sub>3</sub> snižují stabilitu daného aglykonu v neutrálním prostředí. Stablnější jsou anthokyany při pH=7, způsobuje to molekula cukru, která zabraňuje rozpadu molekuly na aldehyd a kyselinu fenolovou (obr. 12) [23].



Obr. 12 : Reakce rozpadu chalkonu při pH=6. R<sub>1</sub>= H nebo cukr, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>=H, CH<sub>3</sub> [23].

V hroznech je z anthokyanů nejvíce zastoupen obvykle malvidin-3-glukosid. Dalšími pigmenty ovlivňujícími barvu vína jsou anthokyanidiny (obr. 13): peonidin,

petunidin, kyanidin, delfinidin a pelargonidin. Tyto aglykony se mezi sebou liší polohou a typem substituentů na kruhu B [7].



Obr. 13 : Anthokyanidin va flavyliové formě [11]

Absorpční maxima těchto sloučenin jsou v rozmezí vlnových délek  $\lambda_{\max}=510-540$  nm [11].

#### **4.3.3. Chemické reakce probíhající ve víně během stárnutí**

Během stárnutí červeného vína dochází k výrazným změnám v barvě. Je to způsobeno chemickými reakcemi, které ve víně probíhají. Dochází k poklesu monomerních anthokyanů a nárůstu polymerních pigmentů [24].

Barva vína je závislá na chemickém složení hroznů, na enologických a klimatických podmínkách. U mladých vín je barva červeno-modrá, ale během stárnutí se mění na červeno-hnědou. Stejně jako barva se mění i trpkost vína, která se postupně snižuje [25], [26]. Tyto procesy jsou způsobeny nejen aktivními kondenzačními reakcemi, ale i tzv. mikro-oxygenací, během které se do uskladněného vína zavádí určité množství vzdušného kyslíku, který způsobí změny v barvě, dojde k navýšení barevné hustoty, ke stabilitě a vyšší odolnosti proti bělení způsobenému SO<sub>2</sub> [26]. Čeští vinaři tento proces využívají hlavně ke zjemnění chuti vína a ke snížení celkové trpkosti.

U mladých vín dochází k chemickému procesu *kopigmentace*. Jde o reakci barevných pigmentů (anthokyanů) a nebarevných organických sloučenin

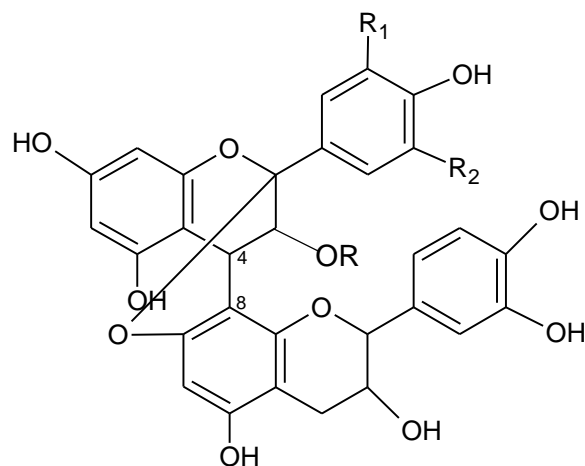
vyskytujících se ve víně, např. acetaldehyd, fenolické kyseliny, flavonoidy, flavanoly či ionty kovů. Bezbarvými komponenty bývá nejčastěji acetaldehyd, který je v mladém víně přítomen jako metabolit kvasinek po procesu fermentace. Kopigmentem jsou bezbarvé sloučeniny, které jsou bohaté na  $\pi$ -elektrony a jsou schopny interagovat s flavyliovým kationtem [23], [27].

Tímto procesem dochází k navýšení stability barvy vína, která je poté odolnější vůči oxidačním vlivům a působení  $\text{SO}_2$ . Posunuje se vlnová délka k vyšším hodnotám, o 5-10 nm a tím se zvýší absorpce flavyliového kationtu. [23], [27].

V závislosti na pH mohou antokyany působit jako elektrofilní činidla ve flavyliové formě (na pozicích C2 a C4 kruhu C) nebo jako nukleofilní činidla v hemiketalové formě (na pozicích C6 a C8 kruhu A). K odbarvování červeného vína dochází reakcí s vodou na pozici C2 nebo s  $\text{SO}_2$  na pozici C4 flavyliového kationtu. Ke zvýšení stability barvy dochází díky kopigmentačním reakcím nebo kondenzačním za vzniku stabilních barevných pigmentů [14].

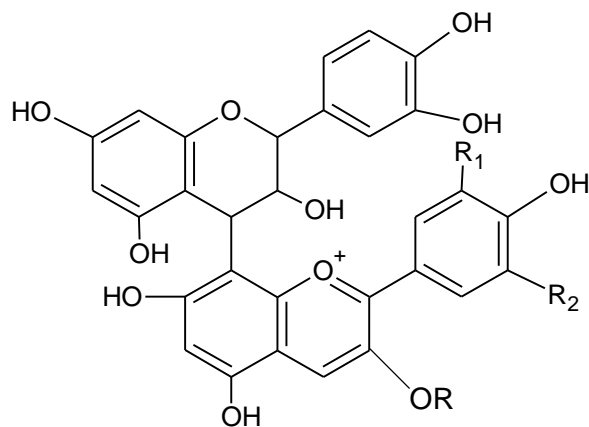
Bylo zjištěno, že kondenzační reakce mohou probíhat třemi mechanismy [25]. Prvním je přímá kondenzace mezi flavanoly a anthokyany. Druhým je reakce flavanolu a anthokyanu zprostředkovaná přes acetaldehyd a třetím typem je cykloadiční proces mezi anthokyany a některými metabolity kvasinek, které mají dvojnou vazbu.

*Přímá kondenzační reakce mezi flavanoly a anthokyany.* Během této reakce vznikají dva typy produktů flavanol-anthokyan (F-A) a anthokyan-flavanoly (A-F) [14]. Reakce u produktu (A-F) začíná nukleofilním atakem flavanolu v pozicích C6 nebo C8 na elektrofilní uhlík pozice C4 flavyliového kationtu anthokyanu za vzniku flavenu, který je dále oxidován flavyliovým kationtem a následně dehydrogenován za vzniku xanthylkové soli žluté barvy. Místo flavenu může vzniknout bezbarvý bicyklický produkt (obr. 14 na následující straně) [25], [28], [29].



Obr. 14 : A-F produkt. R=Glc, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>=H, OH, OCH<sub>3</sub> [14]

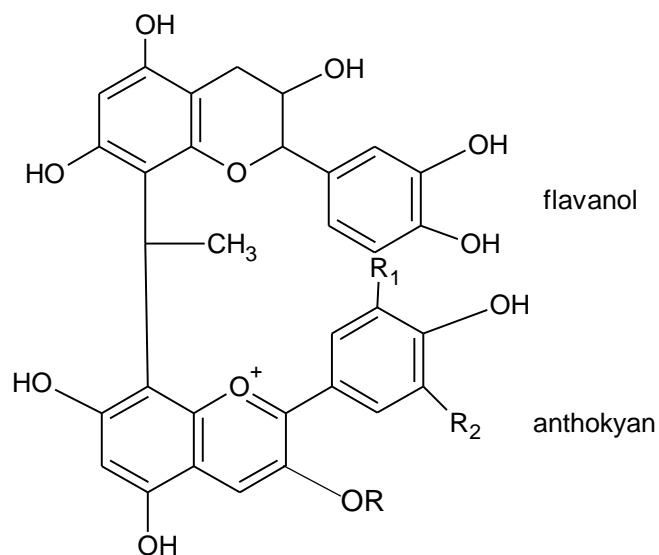
Produkt F-A vzniká reakcí karbokationtu flavanolu s nukleofilním uhlíkem C6 nebo C8 anthokyanu v jeho hemiketalové formě za vzniku bezbarvého dimeru, který může být dále dehydrován na červený flavyliový kation (obr. 15) [14], [28], [29].



Obr. 15 : F-A produkt. R=Glc, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>=H, OH, OCH<sub>3</sub> [14]

*Kondenzační reakce flavanolu a anthokyanu zprostředkovaná přes acetaldehyd.* Acetaldehyd je produktem metabolismu kvasinek nebo vzniká oxidací fenolických sloučenin za vzniku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, který dále oxiduje ethanol. Acetaldehyd reaguje s flavanolem nebo s taninem na uhlících C6 nebo C8 za vzniku karbokationtového intermediátu, který interaguje s další molekulou flavanolu nebo

s anthokyanem ve formě hemiketalu. Flavanol je připojen přes ethylový můstek v pozicích C8 nebo C6 a anthokyan v pozici C8 (obr. 16). Výslednou sloučeninou je chinoidní báze, která je stabilizovaná deprotonizací a má fialovou barvu [14], [25], [30-31].



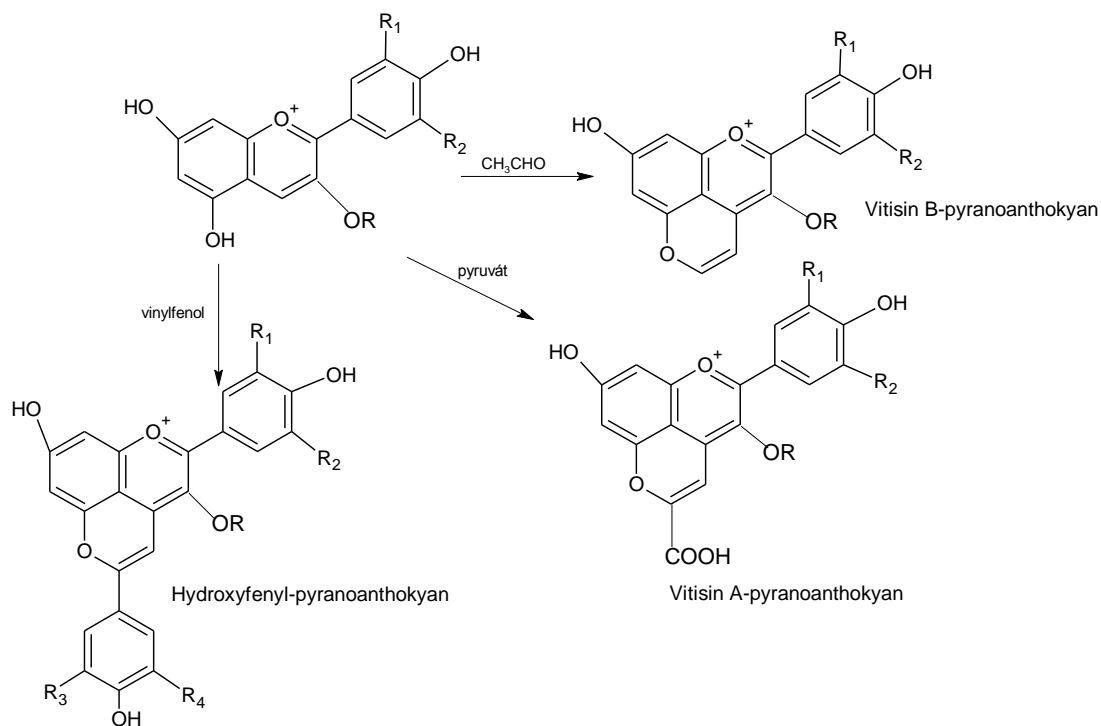
Obr. 16 : Flavanol-ethyl-anthokyan. R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>=H, OH, OCH<sub>3</sub> [25]

Rozdíl mezi přímou a zprostředkovanou kondenzací je v zastoupení jednotlivých složek [30]. Zatímco přímá kondenzace závisí pouze na koncentraci a vlastnostech fenolických látek v extraktu, zprostředkovanou kondenzací ovlivňuje dostupnost volného acetaldehydu. Výsledkem obou kondenzací je zvýšení barevné hustoty a změna celkové barvy vína.

Posledním typem reakcí probíhající ve víně během stárnutí je *cykloadiční proces* mezi anthokyany a některými metabolity kvasinek, jako jsou vinylfenol, pyruvát, acetaldehyd. Výslednými produkty jsou stabilní pigmenty rezistentní proti působení SO<sub>2</sub>. Strukturně jsou podobné pyranoanthokyanům (obr. 17) [25], [33].

Všechny zmíněné reakce ovlivňují barvu a stabilitu vína, stejně tak i chuťovou kvalitu. Struktura konečných produktů závisí na počátečním složení vína, ale i na přítomnosti metabolitů kvasinek a expozici kyslíku [25].



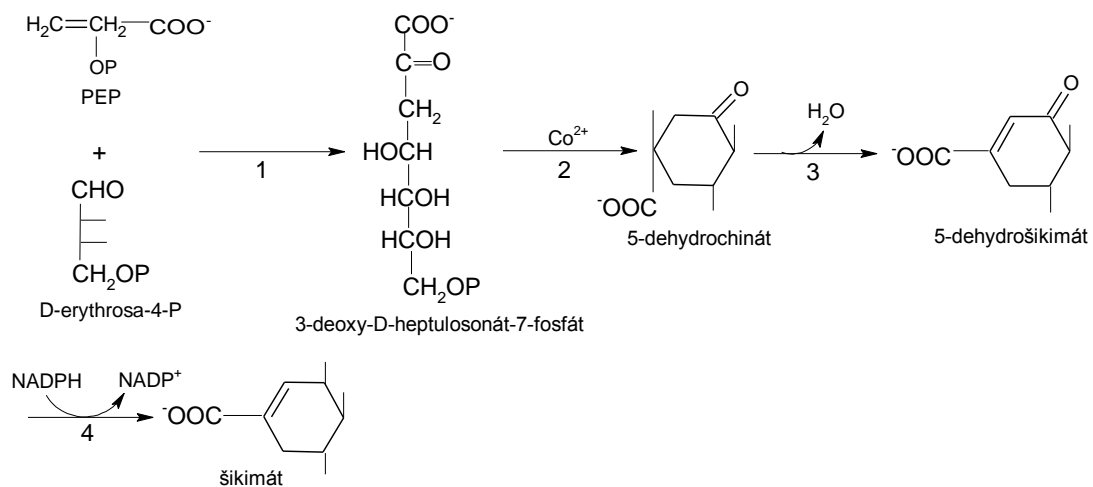


Obr. 17 : Typy pyranoanthokyanů vzniklých cykloadiční reakcí podle [14]. R-Glc,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ -H, OH,  $OCH_3$ .

#### **4.3.4. Biosyntéza flavonoidů**

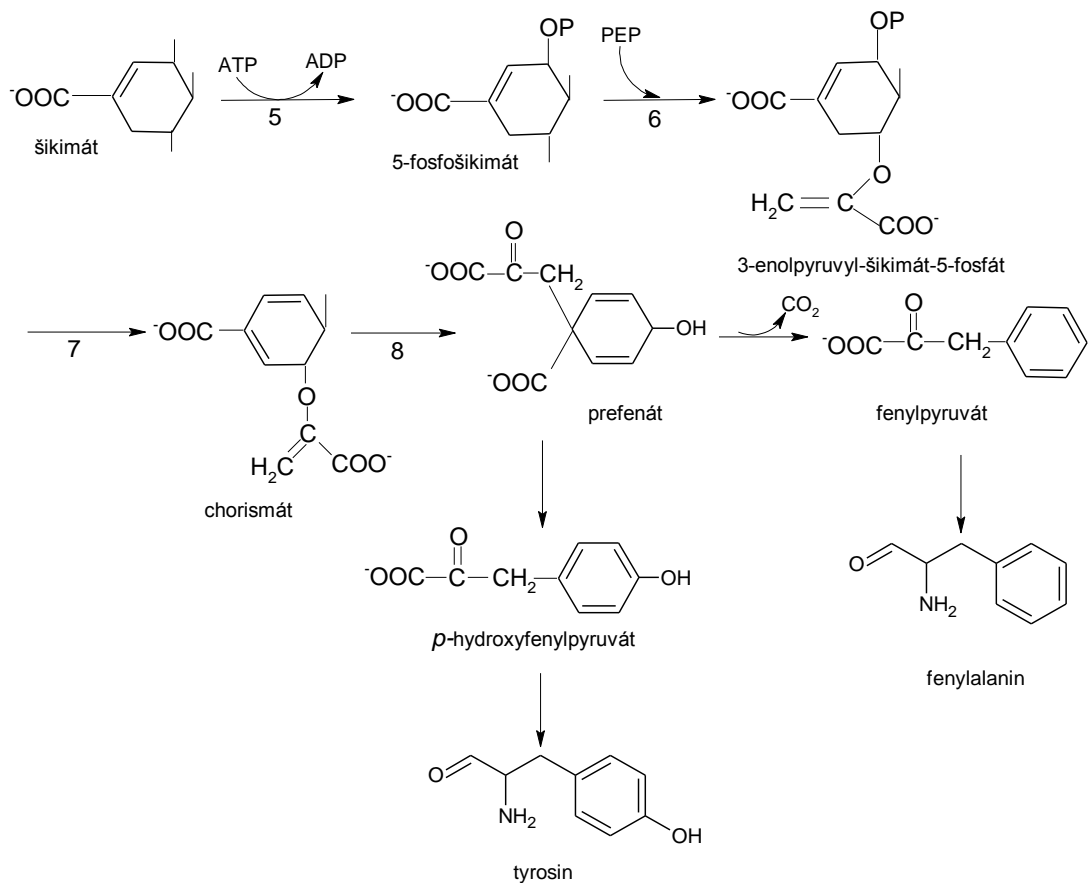
Flavonoidy se v cytoplazmě rostlin syntetizují dvěma metabolickými cestami: šikimátovou a fenyylpropanoidovou (acetát-malonátovou) [9], [34], [35].

Prvním krokem těchto biosyntéz je tvorba šikimové kyseliny (obr. 18) a z ní následně syntéza aromatických aminokyselin, fenyylalaninu, tyrosinu a tryptofanu (Phe, Tyr, Trp) (obr.19). Syntéza začíná reakcí fosfoenolpyruvátu (PEP), který vznikl během glykolýzy, s D-erythroso-4-fosfátem, který vznikl v pentosofosfátovém cyklu, za vzniku 3-deoxy-D-heptulosonát-7-fosfátu. Reakce je katalyzována 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfátaldolase (E.C. 2.5.1.54). Dalším krokem je tvorba 5-dehydrochinátu za katalýzy 5-dehydrochinátsynthasou (E.C. 4.3.3.4) a kobaltem. Následně dojde k dehydrataci působením enzymu 5-dehydrochinátdehydratasy (E.C. 4.2.1.10) za vzniku 5-dehydrošikimátu, který se působením šikimátdehydrogenasy (E.C. 1.1.1.25) mění na šikimát [9], [13], [34-39].



Obr. 18 : Biosyntéza šikimové kyseliny. 1: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfátaldolasa, 2: 5-dehydrochinátsynthasa, 3: 5-dehydrochinátdehydratasa, 4: šikimátdehydrogenasa podle [36]

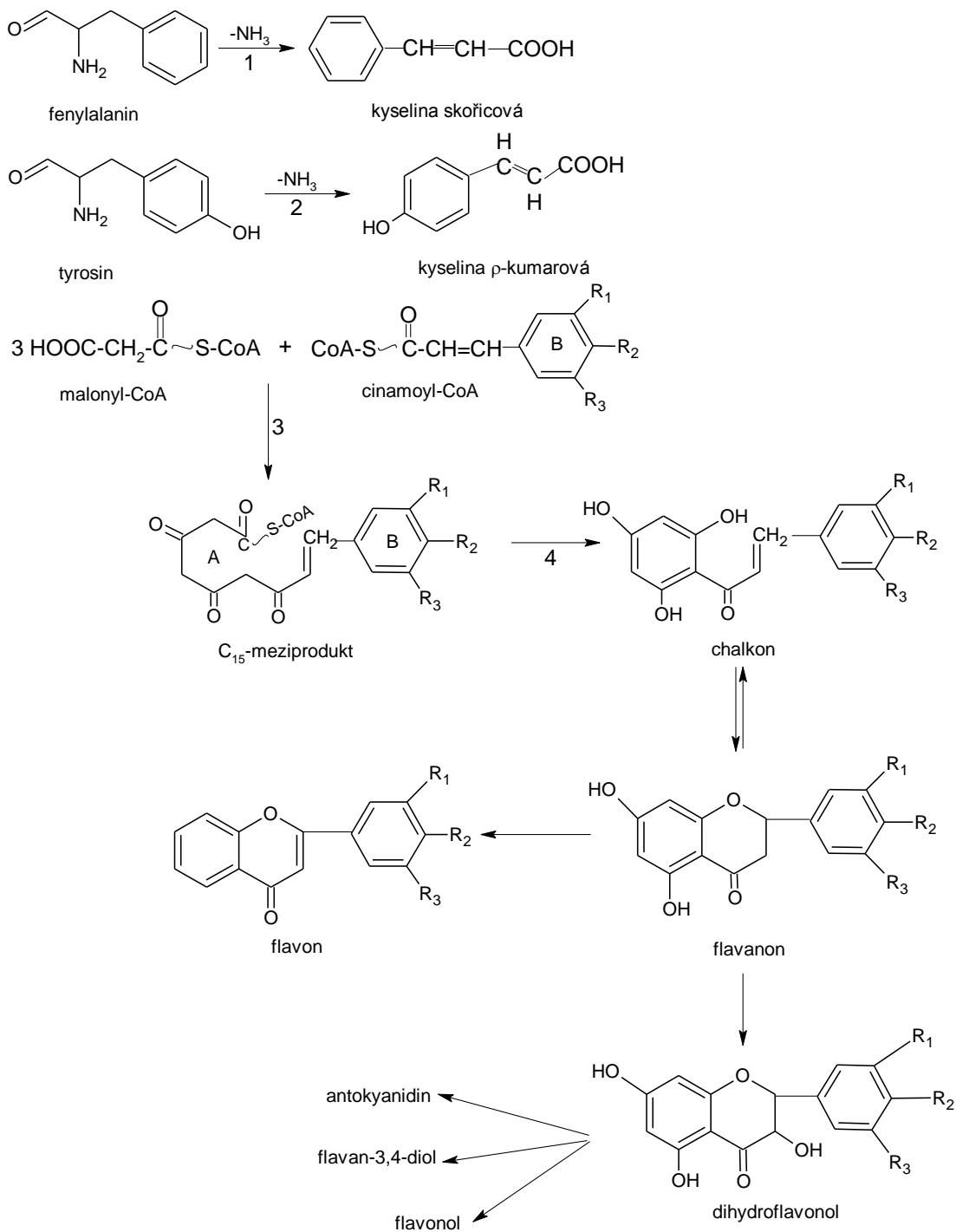
Kyselina šikimová je jedním z prekurzorů biosyntézy aromatických aminokyselin. Prvním krokem je fosforylace šikimátu na 5-fosfošikimát. Na něj se napojí další molekula PEP a vznikne 3-enolpyruvyl-šikimát-5-fosfát. Ten se působením chorismátsynthasy (E.C. 4.6.1.4) transformuje na chorismát. Po vzniku tohoto produktu může vzniknout přes kyselinu anthranilovou tryptofan a z něho dále fytohormon kyselina 3-indolyloctová a nebo fenylalanin a tyrosin. Chorismát se působením chorismátmutasy-prefenátdehydrogenasy (E.C. 1.3.1.12) transformuje na kyselinu prefenovou. Z ní může jednou cestou vzniknout přes fenylpyruvát fenylalanin nebo přes *p*-hydroxyfenylpyruvát tyrosin [9], [13], [34-37], [39].



Obr. 19 : Biosyntéza Tyr a Phe. 5: šikimátkinasa, 6: 3-enolpyruvylšikimát-5-fosfát-synthasa (E.C. 2.5.1.19), 7: chorismátsynthasa, 8: chorismátmutasa podle [13], [36], [39]

Po syntéze aromatických aminokyselin následuje fenylylpropanoidová metabolická cesta, také nazývaná acetát-malonátová, která je považována za základní děj syntézy anthokyanů. Kruh A flavanu je tvořen třemi acetátovými jednotkami, kruh B a atomy uhlíku v heterocyklu pocházejí z fenylylpropanů, z uhlíkatých derivátů kyseliny skořicové a fenylylalaninu. Prvním krokem je oxidativní deaminace fenylylalaninu nebo tyrosinu na *trans*-skořicovou kyselinu a *p*-kumarovou kyselinu působením fenylylalaninamoniumlyasy (FAL, E.C. 4.3.1.24) a tyrosinamoniumlyasy (TAL, E.C. 4.3.1.23). Flavanový skelet se tvoří reakcí malonyl-CoA a CoA-thioesterů kyseliny skořicové a jejich derivátů. Kyselina skořicová nebo *p*-kumarová jsou za katalýzy cinamoyl-CoA-ligas (E.C. 1.2.1.44) převedeny na CoA-thioestery. Enzym *p*-kumaroyl-CoA-ligasa katalyzuje spojení *p*-kumaroylového zbytku

s koenzymem A za vzniku kumaroyl-CoA, který poté reaguje se třemi molekulami malonyl-CoA za současné dekarboxylace. Získáme tak meziprodukt s patnácti uhlíky, chalkon. Uzavřením heterocyklu získáme flavan. Substitučními reakcemi vzniknou různé flavanové deriváty (obr. 20) [9], [34-39].



Obr. 20 : Biosyntéza flavanu. 1: fenylalaninamoniumlyasa (FAL), 2: tyrosinamoniumlyasa (TAL), 3: cinamoyl-CoA-ligasa, 4: chalkosynthethasa (E.C. 2.3.1.74) podle [13], [36], [39].

## **5. CÍLE PRÁCE**

Cílem mé diplomové práce bylo pozorování a analyzování barevných změn, k nimž dochází během stárnutí červeného vína.

Kromě viditelně barevných změn, které byly sledovány pomocí kolorimetrické statistické metody CieLab a modifikovaných metod (stanovení barevné hustoty a odstínu), se stanovovaly i změny v koncentracích barevných pigmentů (anthokyanů a fenolických látek). Sledovalo se, jak moc jejich změna ve složení během měření, ovlivňuje barvu červeného vína.

K analýze byly použity tři nekomerční vzorky červeného vína, Svatovavřínecké (ročník 2010 a 2012) a domácí víno bez přidaného SO<sub>2</sub>, ročník 2010.

## **6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

Chemické stanovení jednotlivých složek vína byla prováděna ihned po otevření lahve, dále pak vždy po týdnu, a to po dobu jednoho měsíce, a následně dvakrát vždy po měsíci.

### **6.1. Chemikálie a roztoky**

K analýze byly použity tři vzorky červeného vína. Jedním bylo nesířené domácí víno nespécifikovatelné odrůdy, ročník 2010, jež bylo darem prof. G. Entlichera. Další dva vzorky (Svatovavřínecké, ročník 2010 a 2012) byly darem prof. J. Ševčíka. Poslední dva zmiňované vzorky se mezi sebou výrazně lišily barvou, i když se jednalo o stejné odrůdy a byl zde použit stejný postup zpracování hroznů.

Vzorky byly uskladněny v lednici v tmavých lahvích při teplotě kolem 7°C a po třech týdnech od otevření bylo víno uchováno paralelně za laboratorní teploty na světle.

Ke stanovení jednotlivých parametrů ve víně byly použity následující chemikálie a roztoky:

- CH<sub>3</sub>CHO – (100%, Reachim, poskytnutý z laboratoře katedry Didaktiky chemie), na stanovení celkových a kopigmentujících anthokyanů o 10% koncentraci.

- Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> – (p.a., Lachema), na stanovení polymerních antokyanů. Pracovní roztok měl koncentraci 2 g/l.

- Acetonitril – (HPLC Far UV/Gradient Grade, Baker HPLC analyzed, USA), použití jako mobilní fáze na HPLC.

- HCOOH – (98%, p.a., Lachema), použití jako mobilní fáze na HPLC.

- Purifikovaná voda – součást mobilní fáze. Purifikovaná voda připravená čištěním vody na Milipore Elix 5 a následně byla dočištěna na HPLC kvalitu na Milipore Simplicity 185.

- Kyselina gallová – (TCI>98%, TCI Europe, Belgie), použití jako standard ke stanovení antioxidační aktivity a celkových fenolických látek.

- Folinovo činidlo – (Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové), ke stanovení antioxidační aktivity.

- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – (p.a., Lachema), ke stanovení antioxidační aktivity. Pracovní roztok byl připraven o koncentraci 20% (w/v).

- Malvidin-3-glukosid (Extrasynthese, Lyon, Francie), použití jako standard ke stanovení mv-3-Glc ve víně.

- HCl – (p.a., Lachema), součást roztoků ke stanovení celkových fenolických látek a antokyanů. Z výchozí koncentrované kyseliny (35%) byly připraveny roztoky o koncentracích 0,1% v 95% EtOH (v/v) a 2% (v/v).

- Ethanol – (96,6% velejmný, p.a., Lachema), součást roztoků ke stanovení celkových fenolických látek a anthokyanů.

- Kalibrační pufrы na měření pH – (pH=4,01, pH=7,01, Sevac, ČR).

## 6.2. Přístroje

**HP spektrofotometr 8453** (Agilent Technologies, USA) byl použit k měření absorbancí a transmitancí v UV a VIS oblasti v rozsahu vlnových délek 280-765 nm. (Měření bylo prováděno v 1 cm a 0,1 cm kyvetách. Integrační čas byl 1 s.)

**Kapalinový chromatograf Agilent 1200** (HPST, ČR) vybavený automatickým dávkovačem, ternárním čerpadlem, spektrofotometrickým diodovým polem, softwarem ChemStation Agilent 1200 pro řízení přístroje a vyhodnocování naměřených dat. Kolona **Nucleosil C18 HD** 100-5, Macherey Nagel, Německo. Byl použit k analýze anthokyanů.

**pH metr** (HI 2211 pH/ORP Meter, Hanna instruments) byl použit ke stanovení pH jednotlivých vzorků.

**Analytické váhy Pesa** (40SM-200A) byly použity k navážení standardu malvidin-3-glukosidu a kyseliny gallové.

**Předvážky Schoeller** (OHAUS Discovery) byly použity k navážení větších množství látek, například  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

**Třepačka** (Yellow line Os2basic) byla použita k okysličení vzorků vína po dobu 45 minut.

### 6.3. Metody

Ve vzorcích červeného vína se stanovovala změna barvy během stárnutí po dobu několika týdnů. Kromě barvy se stanovovala i antioxidační aktivita, změna pH a hustoty a nakonec celkové množství fenolických látek a anthokyanů, které výrazně ovlivňují zbarvení.

#### **6.3.1. Metoda RP HPLC ke stanovení malvidin-3-glukosidu**

Ke stanovení celkové koncentrace malvidin-3-glukosidu byla použita metoda vysokotlaké kapalinové chromatografie na reverzní fázi (HPLC-RP). Vzorek vína byl před analýzou filtrován přes mikrofiltr (0,45  $\mu\text{m}$ ) a poté byl injektován (50  $\mu\text{l}$ ) automaticky pomocí autosampleru na kolonu. Kolona nebyla termostatována, teplota byla laboratorní v rozmezí hodnot 21-25°C. Průtok mobilní fáze byl 0,800 ml/min. Byl použit VIS detektor, jelikož data byla sbírána při vlnové délce 518nm. Celková analýza jednoho vzorku trvala 45 minut a čas k vyrovnání prodlev mezi analýzami byl 5 minut. K analýze byla použita gradientová eluce (viz tabulka č. 1). Mobilní fáze A se skládala z deionizované vody, kyseliny mravenčí (98%) a ACN (100%) v poměru 87:10:3 (v/v/v). Mobilní fáze B obsahovala tytéž kapaliny ale v jiném poměru: 40:10:50 (v/v/v). Metoda byla prováděna podle Mezinárodní organizace pro révu a víno (OIV) [40].



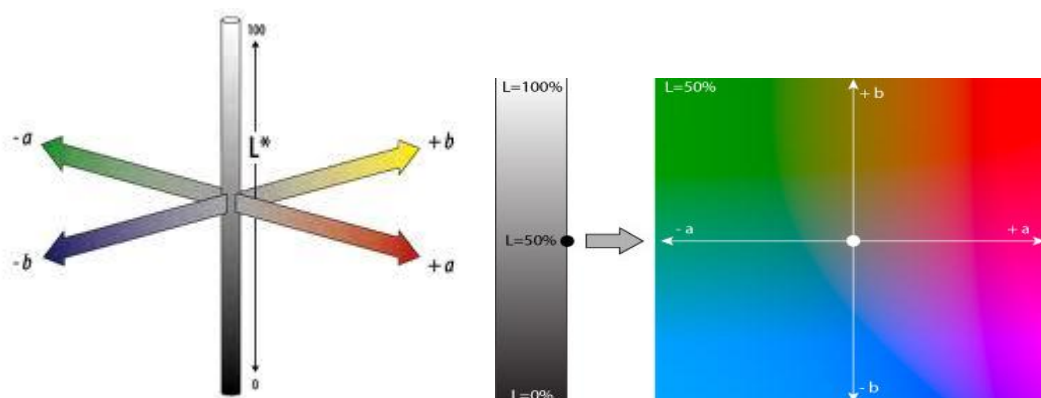
Tabulka č. 1: Průběh gradientové eluce [38]

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0	94	6
15	70	30
30	50	50
35	40	60
41	94	6

### **6.3.2. Metoda CieLab ke stanovení chromatických charakteristik ve víně**

Metoda CieLab je kolorimetrická metoda založená na měření a počítání chromatických charakteristik L, a\*, b\* v souladu s pravidly Mezinárodní komise pro osvětlování (CIE, 1976).

Barva, např. vína, může být popsána použitím třech atributů nebo specifických vlastností vizuálního vnímání: tónem barvy, zářivostí či chromatismem. Kombinací těchto vlastností můžeme definovat různé odstíny vína. Chromatické charakteristiky vína jsou definovány kolorimetrickými souřadnicemi: L, a\*, b\*. L určuje jas nebo čírost vzorku, hodnota a\* udává červeno-zelené složení barvy vína a hodnota b\* modro-žluté složení barvy. Vzorek je černý, neprůhledný, pokud je hodnota L=0. Sledovaná látka je bezbarvá je-li hodnota L=100. Barva sledovaného parametru je červená, je-li souřadnice a\*>0 nebo zelená, pokud je a\*<0. Vzorek je žlutý, když je hodnota b\*>0 nebo modrý, pokud je sledovaná látka b\*<0 [41]. (Grafické vyjádření kolorimetrických souřadnic je na obr. 21)



Obr. 21: Grafické vyjádření kolorimetrických souřadnic L, a\*, b\* [42]

Hodnoty L, a\*, b\* byly vypočítány na základě spektrofotometrických měření použitím HP spektrofotometru 8453 měřením transmittance v rozmezí vlnových délek 300-800 nm a s použitím skleněné kyvety s optickou dráhou 1 mm [41], [43], [44]. Získané hodnoty transmittance byly převedeny na souřadnice L, a\*, b\* pomocí matematicko-statistického programu (SpectralCalculator) [42].

### **6.3.3. Stanovení barevné hustoty a odstínu**

Alternativní metodou na stanovení barvy červeného vína byla spektrofotometrická metoda podle Gloriese [46], která byla dále modifikována podle publikací [44], [45].

Barevná hustota a odstín byly stanoveny měřením absorbance při vlnových délkách 420 nm, 520 nm a 700 nm. Byla použita skleněná kyveta s optickou dráhou 0,1 cm. Hodnoty barevné hustoty a odstínu se vypočítaly podle vzorců:

$$\text{Odstín} = (A_{420} - A_{700}) / (A_{520} - A_{700})$$

$$\text{Hustota} = (A_{520} - A_{700}) + (A_{420} - A_{700})$$

Čím je nižší hodnota barevné hustoty, tím je barva vína světlejší a čím menší je hodnota barevného odstínu, tím je barva tmavší.

### **6.3.4. Stanovení kopigmentujících, monomerních, polymerních a celkových anthokyanů**

Stanovení zmíněných parametrů je založeno na měření absorbance při  $\lambda=520$  nm. Byl analyzován vzorek čistého vína ( $A^{vina}$ ), dále vzorek s přídavkem 100  $\mu$ l roztoku  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  ( $A^{SO_2}$ ), který se přidával k 1,9 ml vína a vzorek s přídavkem 20  $\mu$ l roztoku  $\text{CH}_3\text{CHO}$  ( $A^{ace}$ ), který byl přidán do vzorku vína o objemu 2,0 ml. Takto připravené roztoky se nechaly 45 minut odstát. Podle následujících rovnic se vypočítalo množství monomerních, polymerních, kopigmentujících a celkových anthokyanů [45], [47].

$$\text{Kopigmentující anthokyanany} = A^{ace} - A^{vina}$$

$$\text{Monomerní anthokyany} = A^{vina} - A^{SO_2}$$

$$\text{Polymerní anthokyany} = A^{SO_2}$$

$$\text{Celkové anthokyany} = A^{ace}$$

$$\text{Kopigmentující anthokyany (\%)} = \frac{A^{ace} - A^{vina}}{A^{ace}} \cdot 100$$

$$\text{Monomerní anthokyany (\%)} = \frac{A^{vina} - A^{SO_2}}{A^{ace}} \cdot 100$$

$$\text{Polymerní anthokyany (\%)} = \frac{A^{SO_2}}{A^{ace}} \cdot 100$$

### **6.3.5. Stanovení anthokyanů a celkových fenolických látek**

Anthokyany a celkové fenolické látky se stanovovaly spektrofotometricky, s použitím skleněné kyvety s optickou dráhou 1 cm. Vzorek vína byl nejdříve naředěn (odebralo se 0,5 ml vína a naředil se 5,0 ml 12% ethanolu), následně se odebralo 0,25 ml a postupně se ke vzorkům přidávalo 0,25 ml 0,1% HCl v 95% EtOH a 4,55 ml 2% HCl a roztoky se nechaly 15 minut odstát na vybarvení.

Na stanovení anthokyanů se měřila absorbance při  $\lambda=520$  nm. Pro sestrojení kalibrační křivky byl použit standard malvidin-3-glukosid rozpuštěný ve 12% ethanolu. Z rovnice regrese byla poté vypočtena koncentrace anthokyanů vyskytujících se ve víně (mg/l).

Celkové fenolické látky se měřily při  $\lambda=280$  nm proti standardu roztoků kyseliny gallové o různých koncentracích ve 12% ethanolu. Ze standardů byla následně sestrojena kalibrační křivka a z rovnice regrese byla vypočítána koncentrace anthokyanů a celkových fenolických látek [44], [45], [48].

### **6.3.6. Stanovení antioxidační aktivity**

Antioxidační aktivita se stanovovala spektrofotometricky při  $\lambda=765$  nm. Byla použita skleněná kyveta s optickou dráhou 1 cm.

Do 50 ml baňky se přidal 1 ml vína a naředil se 5 ml destilované vody, přidalo se 2,5 ml Folin-Ciocalteuova činidla a 7,5 ml roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , baňka se doplnila po rysku destilovanou vodou a roztoky se nechaly dvě hodiny odstát k vybarvení. Hodnota celkových fenolických látek se vyjádří jako mg kyseliny gallové na litr vína. Pomocí standardu (kyselina gallová rozpuštěná ve 12% EtOH) byla sestrojena kalibrační křivka a z rovnice regrese byla vypočtena antioxidační aktivita [48], [49], [50].

## 7. VÝSLEDKY

Experimentální část byla založena na stanovení změny barvy červeného vína během jeho stárnutí po dobu několika týdnů. K analýze byly použity tři vzorky červeného vína, které se mezi sebou lišily na první pohled barvou, ale i chemickým složením, vzhledem k tomu, že jeden vzorek neobsahoval oxid siřičitý.

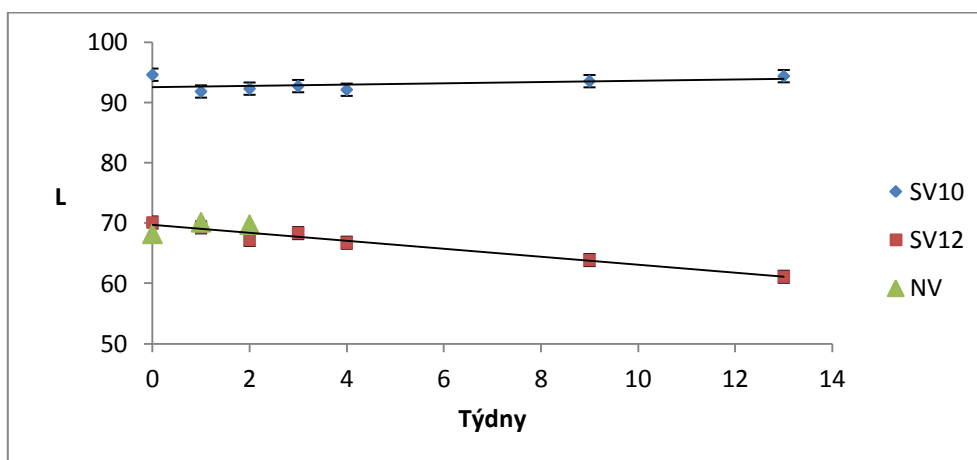
Barva nesířeného vína (NV) byla na začátku analýzy tmavě červená až rubínová. Vzorky Svatovavříneckého vína se mezi sebou výrazně lišily barvou, ročník 2010 (SV10) byl po otevření lahve cihlově červený a ročník 2012 (SV12) byl tmavě červený, lehce do fialova.

### 7.1. Změny barvy během stárnutí

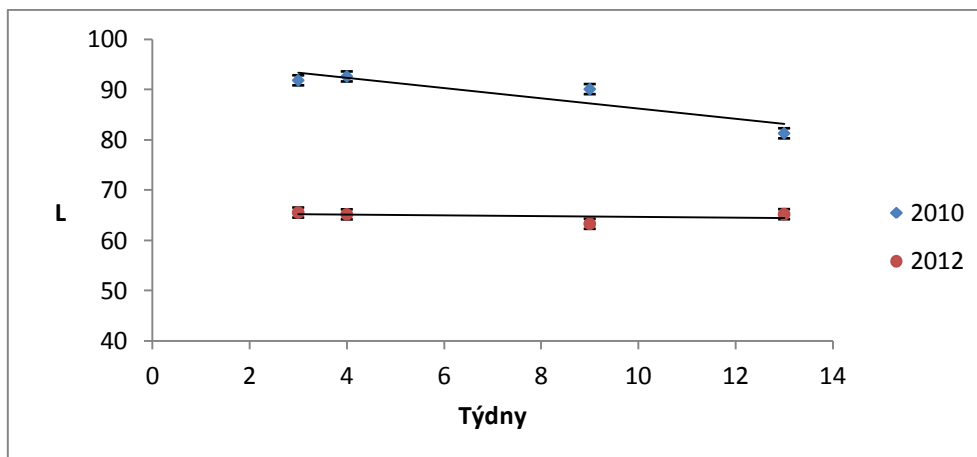
#### 7.1.1. Metoda CieLab

Hodnota L určuje jas nebo čírost vzorku. Pokud je hodnota  $L=0$ , vzorek je černý, neprůhledný,  $L=100$  sledovaná látka je bezbarvá.

V následujících grafech jsou zobrazeny změny jasu či čírosti vína (L) u NV, SV10 a SV12 uchovaných v chladu (obr. 22) a za laboratorní teploty (obr. 23, na následující straně).



Obr. 22: Porovnání změn barvy u NV, SV10 a SV12 uchovaných v chladu



Obr. 23: Porovnání změn barvy u SV10 a SV12 uchovaných za laboratorní teploty

Podle získaných hodnot L byl nejtmaavší vzorek vína SV12, což odpovídá i subjektivnímu vjemu. Z grafů je patrné, že tento parametr leží mezi hodnotami 60 a 70 a během stárnutí dochází ještě k jeho poklesu (obr. 22). Čím je hodnota L nižší, tím je vzorek tmavší. U vzorku SV12, který byl uchován za laboratorní teploty, se parametr L nemění (obr. 23).

U nesířené vína k významným změnám nedošlo, z hodnot L je zřejmé, že tento vzorek byl svou barvou podobný vzorku SV12 (obr. 22).

Vzorek vína SV10 byl ze sensorického hlediska nejsvětlejší. Tomu odpovídají i hodnoty L, které byly v rozmezí 90 až 100 (obr. 22). Čím má parametr L vyšší hodnotu, tím je sledovaný vzorek méně barevný až bezbarvý. Během stárnutí vzorku SV10 uskladněného za laboratorní teploty docházelo k poklesu hodnoty L z 90 na 80 (obr. 23), barva vína se z cihlově červené postupně měnila na tmavě červenou.

Barva vzorku je červená, pokud je souřadnice  $a^* > 0$  nebo zelený, když je  $a^* < 0$ . Když je parametr  $b^* > 0$ , sledovaná látka je žlutá, pokud je  $b^* < 0$  vzorek je modrý. V následující tabulce jsou tyto parametry zobrazeny.

Tabulka č. 2: Porovnání zbarvení u vzorků červených vín

Stárnutí v týdnech	Nesířené víno	2010	2010 v teple	2012	2012 v teple
0.	a*=28,44	a*=7,83	-	a*=37,10	-
	b*=8,43	b*=7,55		b*=0,21	
1.	a*=29,20	a*=7,54	-	a*=37,39	-
	b*=8,81	b*=6,66		b*=1,56	
2.	a*=28,42	a*=7,41	-	a*=37,77	-
	b*=9,17	b*=6,93		b*=1,38	
3.	-	a*=7,71	a*=7,59	a*=40,13	a*=39,67
		b*=7,49	b*=7,84	b*=2,70	b*=2,80
4.	-	a*=7,58	a*=7,67	a*=38,02	a*=36,93
		b*=7,08	b*=8,25	b*=1,98	b*=1,47
9.	-	a*=7,56	a*=12,66	a*=39,84	a*=34,40
		b*=8,31	b*=11,22	b*=3,23	b*=-1,58
13.	-	a*=8,27	a*=20,3	a*=41,4	a*=32,7
		b*=9,13	b*=6,94	b*=1,61	b*=-1,25

Vzorek SV12 byl podle kolorimetrických souřadnic červeno-modrý a během stárnutí po 13 týdnech bylo viditelnější zbarvení do modra, u vzorku uchovaného za laboratorní teploty (tab. 2), jak ukazuje hodnota  $b^*$ , která měla zápornou hodnotu. Z tabulky je patrné, že barva vzorku SV10 je oproti ostatním vzorkům světlejší. Hodnoty  $a^*$  i  $b^*$  jsou si na začátku měření velmi podobné. Parametr  $a^*$  je vzhledem ke vzorkům SV12 a NV velmi nízký (v rozmezí 7-8), tomu odpovídá světle červené zbarvení vína. Během uskladnění vzorku SV10 za laboratorní teploty, dochází k navýšení hodnoty  $a^*$  až na 20,3. Barva vína tak byla tmavě červená. Barva nesířené vína byla červená s odstínem lehce do fialova, během stárnutí se výrazně neměnila. Hodnoty  $a^*$  i  $b^*$  ležely mezi hodnotami u vzorků SV10 a SV12 (tab. 2).

### **7.1.2. Stanovení barevné hustoty a odstínu**

Z metody CieLab bylo zjištěno, že nejtmaším vzorkem červeného vína byl SV12, poté následoval NV a nejsvětlejší byl vzorek SV10. V následující tabulce č. 3 jsou uvedeny hodnoty barevných odstínů u jednotlivých vzorků, které byly stanoveny na základě měřených absorbancí.

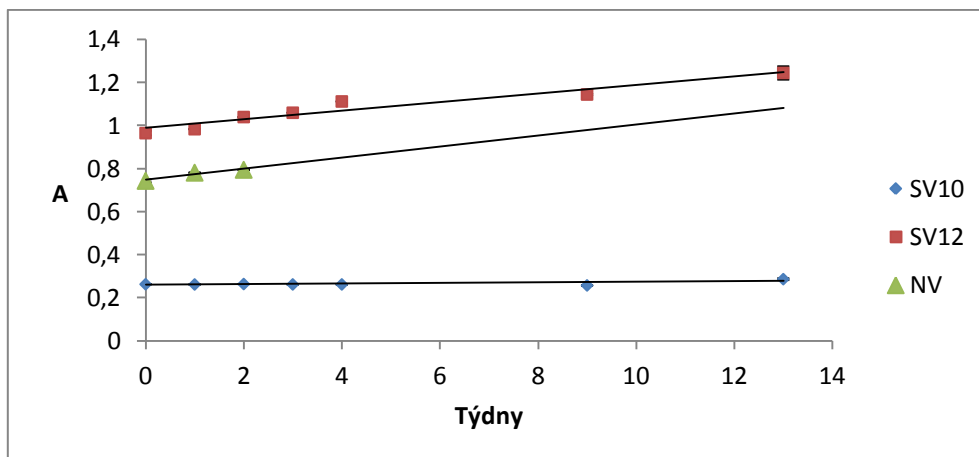
Tabulka č. 3: Barevný odstín u vzorků červených vín

<b>Stárnutí v týdnech</b>	<b>Nesířené víno</b>	<b>2010</b>	<b>2010 v teple</b>	<b>2012</b>	<b>2012 v teple</b>
<b>0.</b>	0,834	1,18	-	0,561	-
<b>1.</b>	0,843	1,22	-	0,565	-
<b>2.</b>	0,859	1,25	-	0,545	-
<b>3.</b>	-	1,19	1,25	0,561	0,568
<b>4.</b>	-	1,22	1,25	0,558	0,568
<b>9.</b>	-	1,26	1,10	0,562	0,558
<b>13.</b>	-	1,22	1,02	0,550	0,570

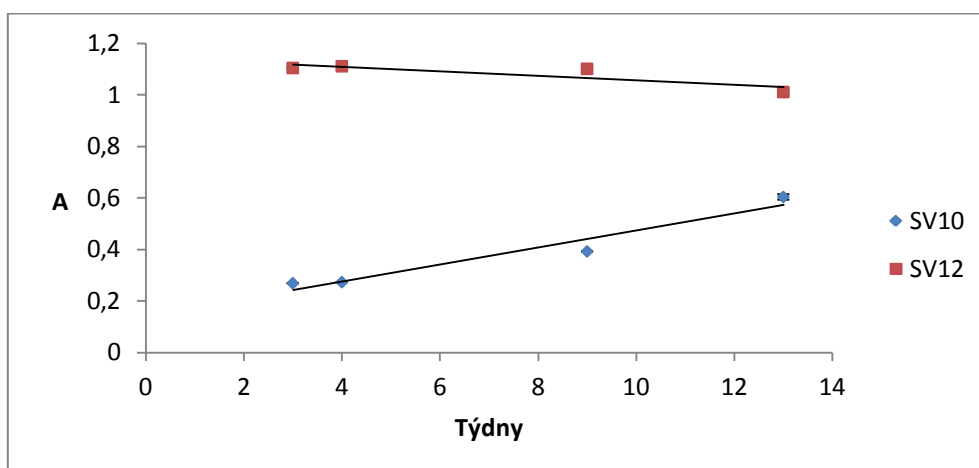
Nejnižší hodnota barevného odstínu v rozmezí 0,545-0,570 byla u vzorku SV12. Během stárnutí k výrazným změnám nedošlo. U vzorku SV10, uchovaného za laboratorní teploty, došlo ke snížení hodnoty barevného odstínu z 1,25 na 1,02 (tab. 3). Barva vína tmavla. Vzhledem k malému množství vzorku NV nelze určit klesající či rostoucí trend barevného odstínu.

Změny v barevných hustotách jsou zaznamenány v následujících grafech.





Obr. 24: Porovnání barevné hustoty u vzorků SV10, SV12 a NV uchovaných v chladu



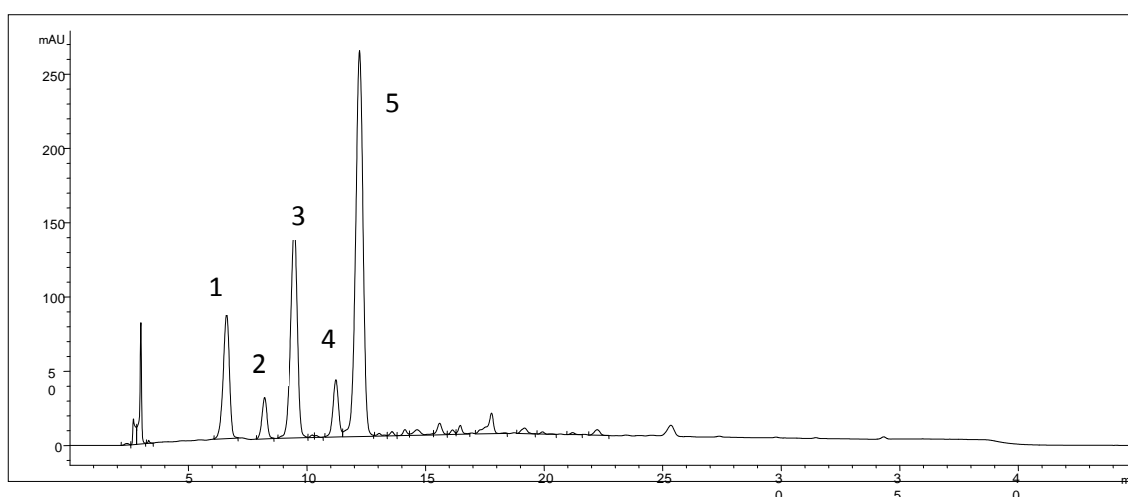
Obr. 25: Barevná hustota u vzorků uchovaných v teple

Z grafů na obrázcích 24 a 25 je zřejmé, že nejvyšší barevnou hustotu měl vzorek SV12, která během uchování v chladu rostla z hodnoty 1,0 až na 1,2. Vzorek SV12 uchovaný za laboratorní teploty měl hodnoty nižší (kolem 1,0) a během stárnutí se moc neměnily (obr. 25). U vzorku SV10, uchovaného v chladu, byly naměřeny hodnoty barevné hustoty v rozmezí 0,2-0,3. Ke změnám docházelo při uskladnění za laboratorní teploty, kdy došlo k navýšení barevné hustoty z hodnoty kolem 0,2 na 0,6. Hustota vzorku červeného vína NV byla mezi hodnotami 0,7-0,8. Tyto získané výsledky odpovídají metodě CieLab.

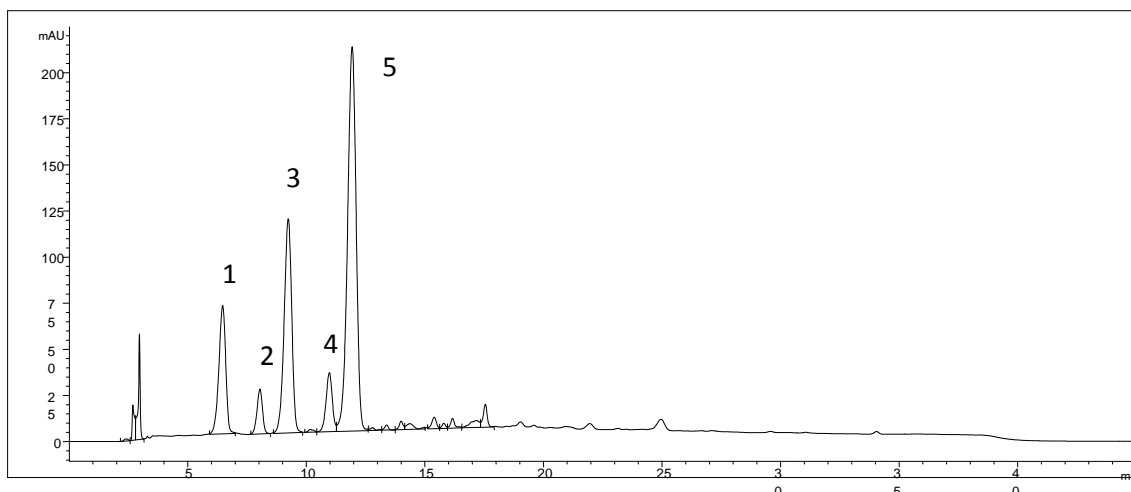
## 7.2. Změny v koncentracích anthokyanů a dalších fenolických látek ovlivňující barvu vína během stárnutí

### 7.2.1. Koncentrace malvidin-3-glukosidu ve víně

Metodou HPLC-RP se dělily anthokyany v závislosti na své hydrofobicitě. Jako standard byl použit malvidin-3-glukosid, který měl retenční čas v patnácté minutě po nástřiku vzorku na kolonu. V následujících chromatogramech jsou zaznamenány změny koncentrace identifikovaného píku malvidin-3-glukosidu a dalších látek. Chromatogramy ukazují analýzu na začátku měření a na konci, po 13 týdnech od otevření lahve. Vzhledem k malému množství vzorku nesířeného vína, byl vorek NV analyzován třikrát.



Obr. 26: Chromatogram NV na začátku pokusu, osa x – retenční čas (min), osa y – odezva detektoru (mAU)- Přiřazení píků je vysvětleno v textu.

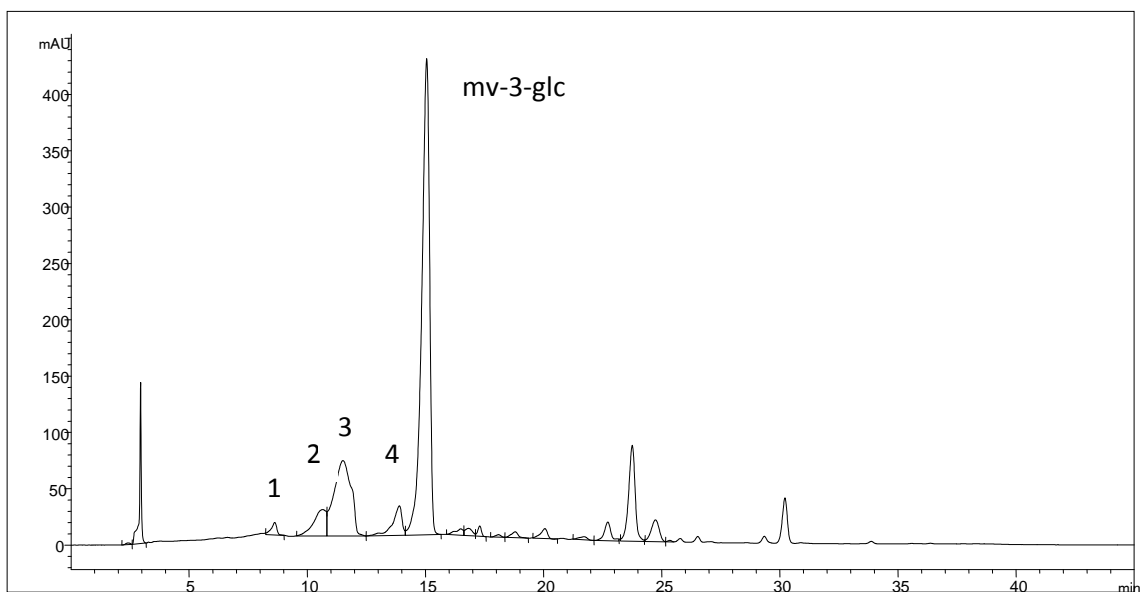


Obr. 27: Chromatogram NV po dvou týdnech od začátku pokusu, osa x – retenční čas (min), osa y – odezva detektoru (mAU). Přiřazení píků je vysvětleno v textu.

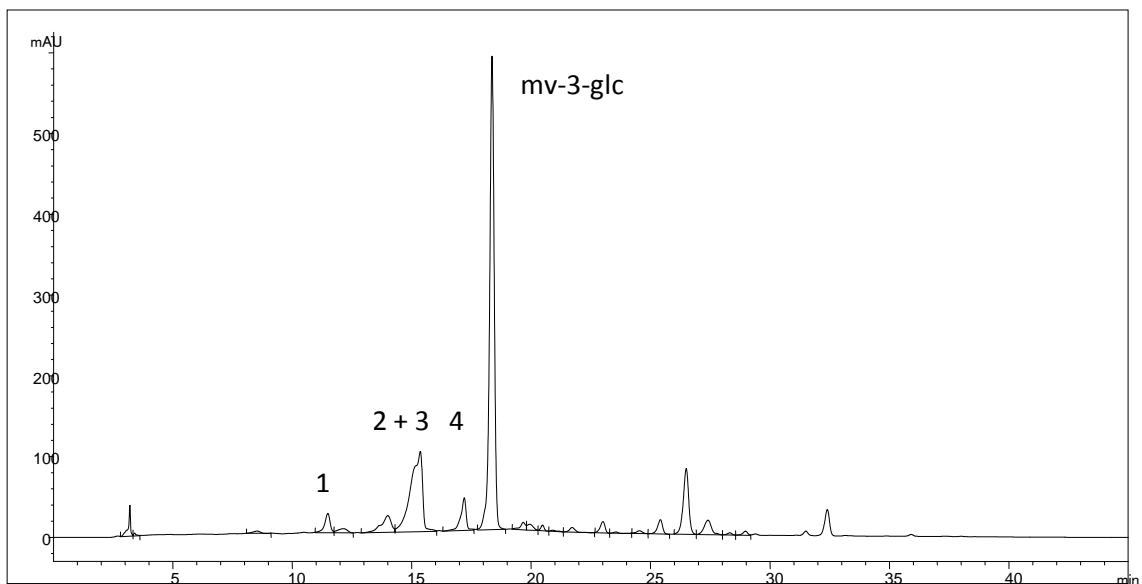
V chromatogramech je vidět, že během stárnutí docházelo k poklesu monomerních anthokyanů. Snižovala se hodnota absorpce (mAU). Na začátku analýzy byla její hodnota u píku č.5 250 mAU a na konci 200 mAU a tím se snížila i plocha píku (obr. 26, 27).

Retenční čas standardu malvidin-3-glukosidu byl v patnácté minutě, u nesířeného vína došlo pravděpodobně k eluci dříve, jak ukazují výsledky. Retenční čas píku č. 5 (který by svou intenzitou měl odpovídat mv-3-glc) byl ve 12. minutě.

Podle údajů v literatuře [40] je v červeném víně pět základních anthokyanů o nejvyšší koncentraci a během chromatografické analýzy elují v pořadí: 1→delfinidin-3-glukosid, 2→kyanidin-3-glukosid, 3→petunidin-3-glukosid, 4→peonidin-3-glukosid, 5→malvidin-3-glukosid. Dalšími píky bývají deriváty anthokyanů, jejich polymery nebo estery s kyselinami salicylovou, kumarovou nebo kávovou.

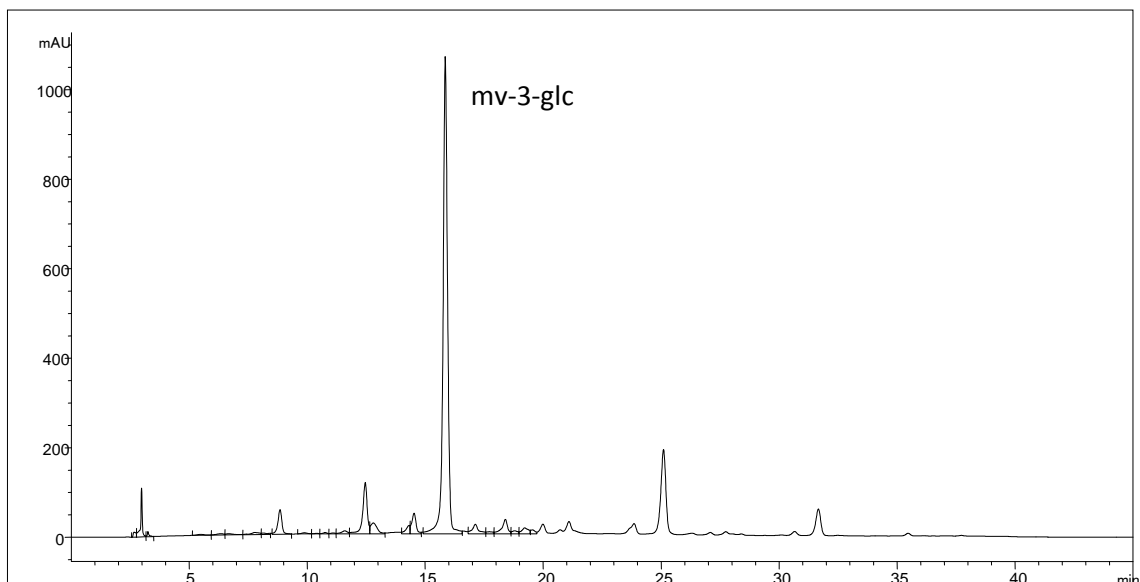


Obr. 28: Chromatogram SV10 uchovaného v chladu na začátku analýzy, osa x – retenční čas (min), osa y – odezva detektoru (mAU). Číslování komponent je stejné, jako na obr. 26.

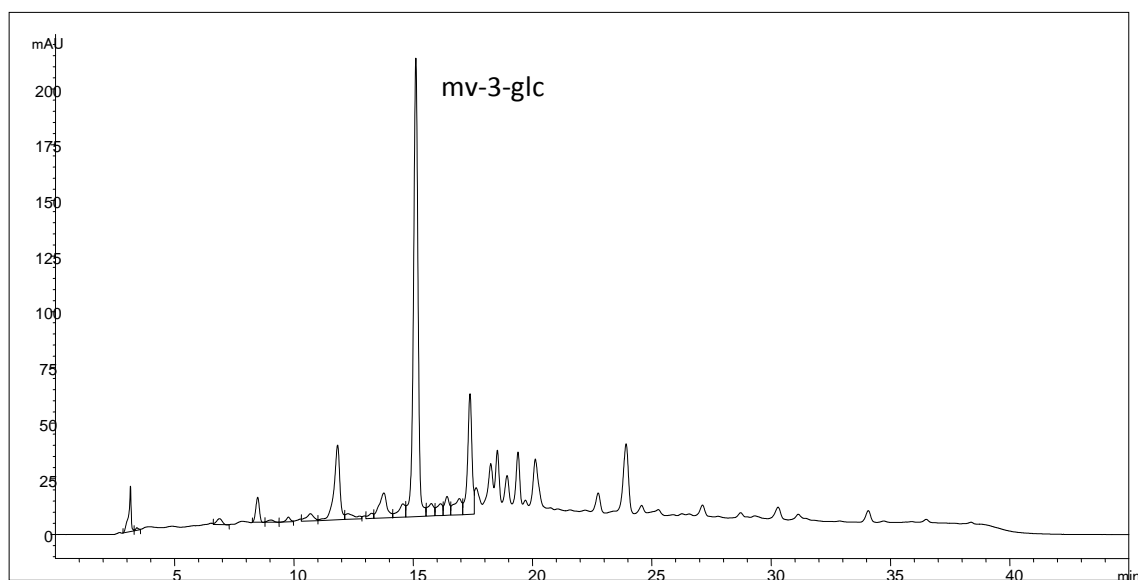


Obr. 29: Chromatogram SV10 uchovaného v chladu po 13. týdnech, osa x – retenční čas (min), osa y – odezva detektoru (mAU). Číslování komponent je stejné jako na obr. 26.

U vzorku SV10 byl zaznamenán pokles monomerních anthokyanů, jak ukazují chromatogramy (obr. 28, 29), zmenšila se plocha píku a tím i koncentrace mv-3-glc. U vzorku SV10 na konci pokusu (po 13 týdnech) došlo ke změně retenčního času mv-3-glc, který místo v 15. minutě eluoval v 18. minutě.



Obr. 30: Chromatogram SV12 uskladněného v chladu na začátku analýzy, osa x – retenční čas (min), osa y – odezva detektoru (mAU)



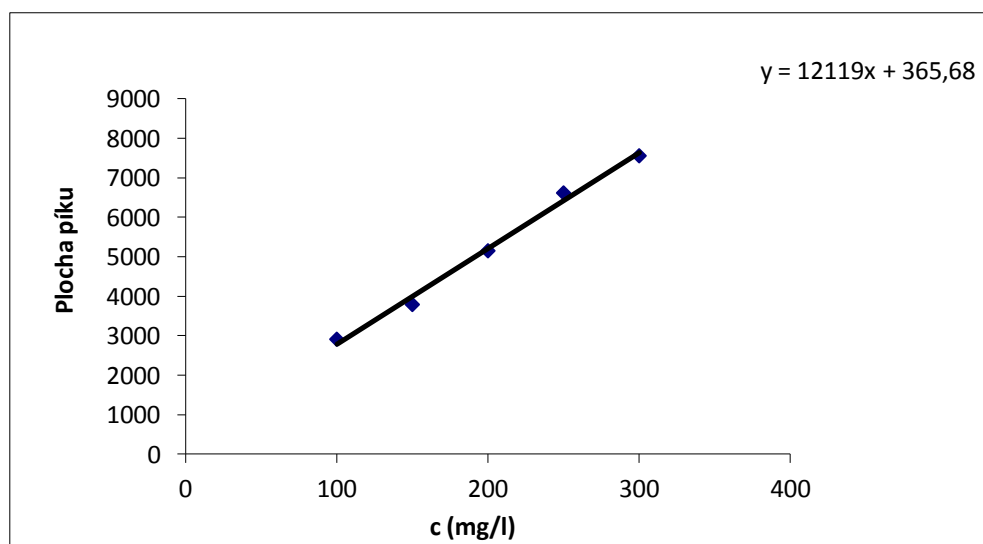
Obr. 31: Chromatogram SV12 uskladněného v chladu po 13 týdnech, osa x – retenční čas (min), osa y – odezva detektoru (mAU)

U vzorku SV12 docházelo také výrazně k poklesu monomerních anthokyanů. Oproti vzorkům SV10 a NV zde byl patrnější výskyt nových píků, tedy nových látek,

oligomerů či různě substituovaných derivátů (retenční čas těchto sloučenin byl mezi 17. a 20. minutou).

U vzorků uskladněných v teple docházelo stejně jako zde k poklesu monomerních anthokyanů. Snížená koncentrace jednotlivých složek zde byla výraznější, bylo to urychleno zvýšenou teplotou a větším přístupem ke vzdušnému kyslíku. Tyto změny a celkové koncentrace budou dále detailně uvedeny (tab. 4).

Ke stanovení koncentrace malvidin-3-glukosidu ve víně byl použit jako standard malvidin-3-glukosid rozpuštěný ve 12% ethanolu a následně byla sestrojena kalibrační křivka. (Koncentrace standardu jsou v rozmezí 100mg/l – 300mg/l)



Obr. 32: Kalibrační křivka pro stanovení mv-3-glc

Tabulka č. 4: Koncentrace mv-3-glc (mg/l) ve vzorcích vína během stárnutí

Stárnutí v týdnech	Nesířené víno	2010	2010 v teple	2012	2012 v teple
0.	217	382	-	561	-
1.	213	387	-	503	-
2.	201	367	-	420	-
3.	-	381	351	445	364
4.	-	376	340	475	192
9.	-	332	193	191	191
13.	-	309	112	108	35

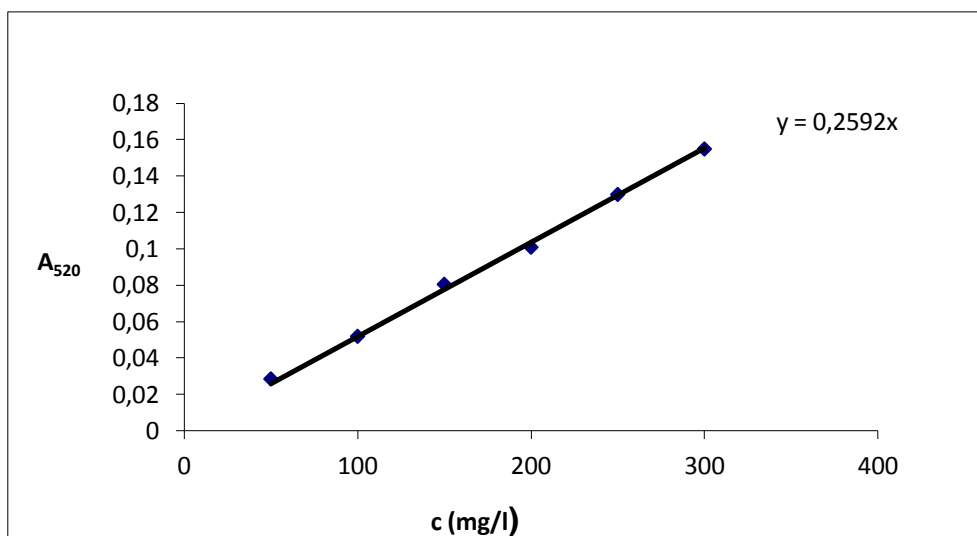
Nejvyšší koncentrace mv-3-glc byla u vzorku SV12, uchovaného v chladu, na začátku měření (561 mg/l). Během stárnutí docházelo ke snížení koncentrace na hodnotu 108 mg/l a u vzorku uchovaném za laboratorní teploty na 35 mg/l.

Ve vzorku SV10 byla oproti vzorku SV12 nižší koncentrace mv-3-glc. Stejně jako v předchozím případě docházelo během stárnutí k jeho poklesu až na hodnotu 309 mg/l (SV10 uchovaný v chladu) a na 112 mg/l (SV10 uchovaný za laboratorní teploty).

Nejméně mv-3-glc bylo obsaženo ve vzorku NV. Koncentrace mv-3-glc byla na začátku měření 217 mg/l a po dvou týdnech klesla na 201 mg/l.

### **7.2.2. Koncentrace celkových anthokyanů ve víně (podle Gloriese [46])**

K sestavení kalibrační křivky byl použit jako standard malvidin-3-glukosid rozpuštěný ve 12% ethanolu. (Koncentrace kalibračních roztoků byla od 50 mg/l do 300 mg/l).



Obr. 33: Kalibrační křivka na stanovení celkových anthokyanů

Tabulka č. 5: Koncentrace celkových anthokyanů během stárnutí (mg/l)

Stárnutí v týdnech	Nesířené víno	2010	2010 v teple	2012	2012 v teple
0.	-	70,8	-	99,7	-
1.	52,0	79,1	-	99,7	-
2.	71,0	74,1	-	94,3	-
3.	-	88,6	67,9	92,2	69,3
4.	-	139,4	125,6	107,9	76,1
9.	-	68,8	55,3	74,3	53,3
13.	-	58,9	28,6	72,3	53,3

Podle této modifikované metody byly koncentrace celkových anthokyanů oproti koncentraci mv-3-glc (stanovené metodou RP-HPLC, tab. 4) výrazně nižší (tab. 5). Nejvyšší koncentrace celkových anthokyanů byla naměřena u vzorku SV12. Během stárnutí docházelo k jejich poklesu z hodnoty 99,7 mg/l na 72,3 mg/l (SV12 uchovaný v chladu) a na hodnotu 53,3 mg/l (SV12 uchovaný za laboratorní teploty).



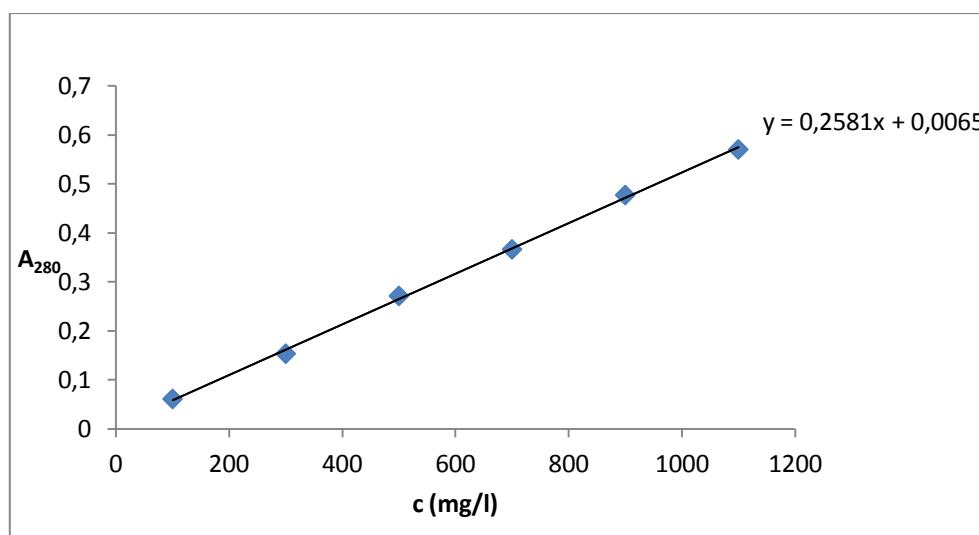
U vzorku SV10 byla počáteční koncentrace celkových anthokyanů vzhledem k SV12 nižší. Koncentrace klesala z hodnoty 70,8 mg/l na 58,9 mg/l (vzorek SV10 uchovaný v chladu) a na 28,6 mg/l (SV10 uchovaný za laboratorní teploty).

U nesířeného vína začalo měření později, proto jsou zde uvedeny pouze dvě hodnoty koncentrací, které byly nižší než u zbývajících dvou vzorků.

Během stárnutí můžeme sledovat výkyvy v koncentraci celkových anthokyanů, pokles zde není lineární (tab. 5). Může to být způsobeno rozdílným odebíráním vzorků z míst o různé koncentraci anthokyanů, které může způsobit rozdílné koncentrace během analýzy.

### **7.2.3. Stanovení koncentrace celkových fenolických látek**

K sestrojení kalibrační křivky byl použit standard kyseliny gallové ve 12% ethanolu. Absorbance byla měřena při  $\lambda=280$  nm. Celkové fenolické látky byly stanoveny pouze u Svatovavříneckých vín, jak u vzorků uchovaných v chladu, tak i za laboratorní teploty.



Obr. 34: Kalibrační křivka ke stanovení koncentrace celkových fenolických látek

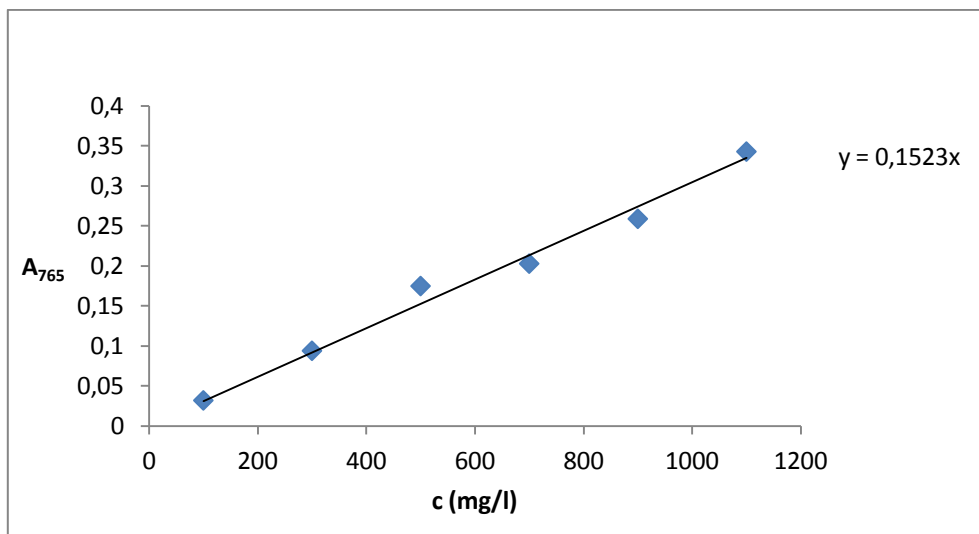
Koncentrace celkových fenolických látek kolísala během měření. Byl zaznamenán prudký nárůst (u vzorku SV10 mezi druhým a čtvrtým týdnem, z hodnoty 194 mg/l na 358 mg/l), ale i pokles (SV10 z hodnoty 358 mg/l na 143 mg/l) (tab. 6). Tento jev mohl být způsoben rozdílným pipetováním vzorku, kdy docházelo k odebírání vína v různých vrstvách, ve kterých byly odlišné koncentrace jednotlivých složek.

Tabulka č. 6: Koncentrace celkových fenolických látek během stárnutí (mg/l)

Stárnutí v týdnech	2010	2010 v teple	2012	2012 v teple
0.	172	-	-	-
1.	214	-	197	-
2.	194	-	209	-
3.	222	166	155	118
4.	358	342	228	172
9.	176	164	149	139
13.	143	150	197	167

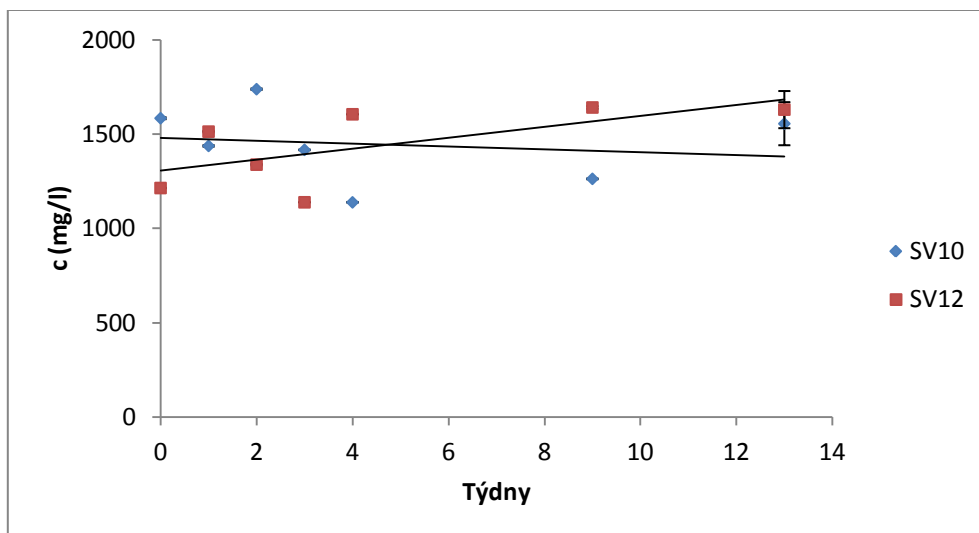
#### **7.2.4. Stanovení antioxidační aktivity**

Antioxidační aktivita byla stanovena pouze u vzorků Svatovavřineckého vína. Byla vyjádřena jako ekvivalentní množství kyseliny gallové (mg/l). Jako standard byla použita kyselina gallová rozpuštěná ve 12% ethanolu. Byla sestrojena kalibrační křivka a ze získané rovnice regrese byla poté vypočítána zmíněná antioxidační aktivita. Absorbance byla měřena při  $\lambda=765$  nm.



Obr. 35: Kalibrační křivka na stanovení antioxidační aktivity

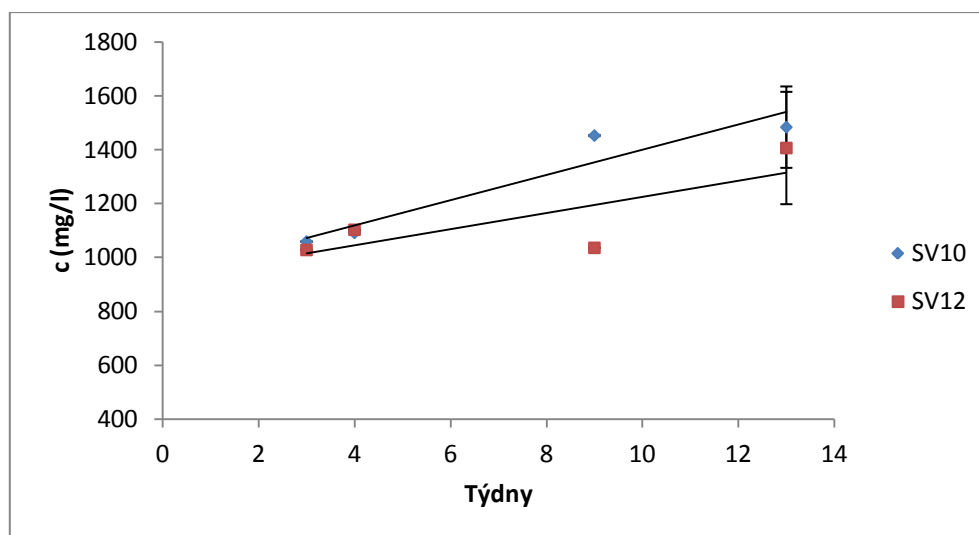
Hodnoty antioxidační aktivity velmi kolísaly (obr. 38). U vzorků uchovaných za laboratorní teploty, je viditelný nárůst během stárnutí (obr. 38), zatímco u ročníků uchovaných v chladu jednou koncentrace stoupají a poté zase klesají.



Obr. 36: Antioxidační aktivita u vzorků SV10 a SV12 uchovaných v chladu

Z grafu (obr. 36) je patrné, že antioxidační aktivita vzorku SV12 na začátku měření klesala, ale během stárnutí došlo k jejímu navýšení až k hodnotě 1500 mg/l.

Vzorek SV10 měl po otevření lahve oproti vzorku SV12 vyšší hodnotu antioxidační aktivity, která ale postupně klesala, ale na konci analýzy, po 13 týdnech, byl také zaznamenán její nárůst.



Obr. 37: Antioxidační aktivita u vzorků SV10 a SV12 uchovaných za laboratorní teploty

U vzorků vín uchovaných za laboratorní teploty došlo k navýšení antioxidační aktivity z hodnot kolem 1000 mg/l na 1400 mg/l.

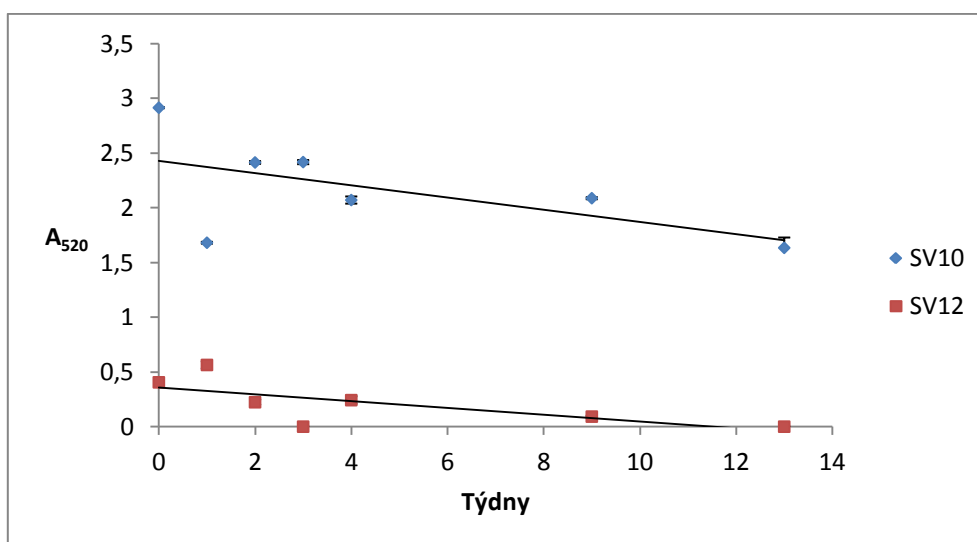
Z následující tabulky (tab. 7) je patrné, že vyšší hodnoty antioxidační aktivity byly u vzorku SV10, to by odpovídalo vyšším koncentracím fenolických látek vyskytujících se ve víně (tab. 6)

Tabulka č. 7: Hodnoty antioxidačních aktivit u ročníků 2010 a 2012 (mg/l)

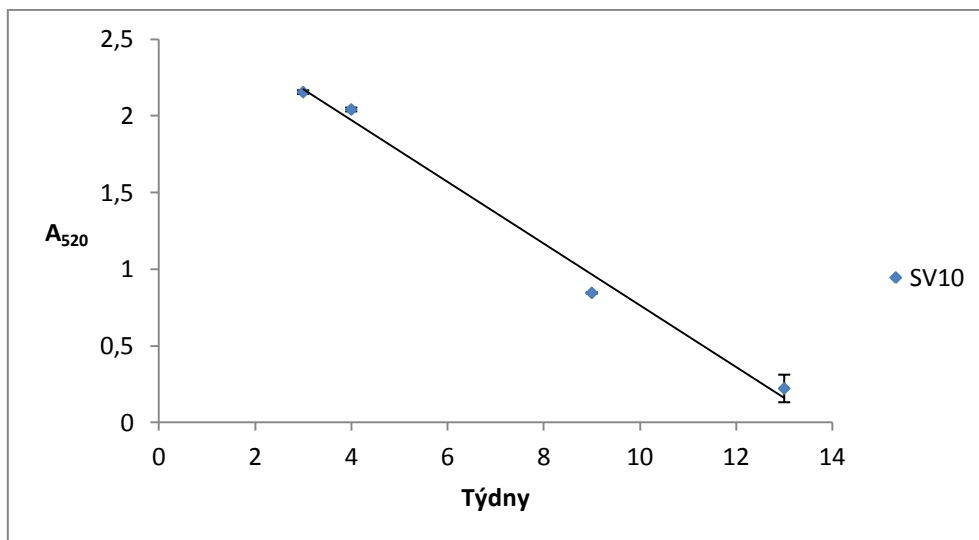
Stárnutí v týdnech	2010	2010 v teple	2012	2012 v teple
0.	1583	-	1213	-
1.	1436	-	1512	-
2.	1737	-	1337	-
3.	1415	1058	1137	1027
4.	1137	1090	1604	1101
9.	1261	1451	1640	1035
13.	1554	1483	1629	1405

### 7.2.5. Stanovení kopigmentujících, monomerních, polymerních a celkových anthokyanů

Hodnoty těchto parametrů jsou vyjádřeny jako absorbance, která byla měřena při  $\lambda=520$  nm, a následně byla násobena deseti (hodnoty absorbancí jsou tedy v rozmezí 0,0-3,0, obr. 38).



Obr. 38: Koncentrace kopigmentujících anthokyanů u vzorků SV10 a SV12 uchovaných v chladu



Obr. 39: Koncentrace kopigmentujících anthokyanů u vzorku SV10 uchovaných za laboratorní teploty

U obou vzorků (SV10 a SV12) je patrný výrazný pokles kopigmentujících anthokyanů. Z obrázku 38 je zřejmé nižší zastoupení těchto látek (u vzorku SV12 oproti SV10), jejich hodnota klesá z původní koncentrace kolem 0,5 na 0,0, došlo k jejich úplnému zreagování.

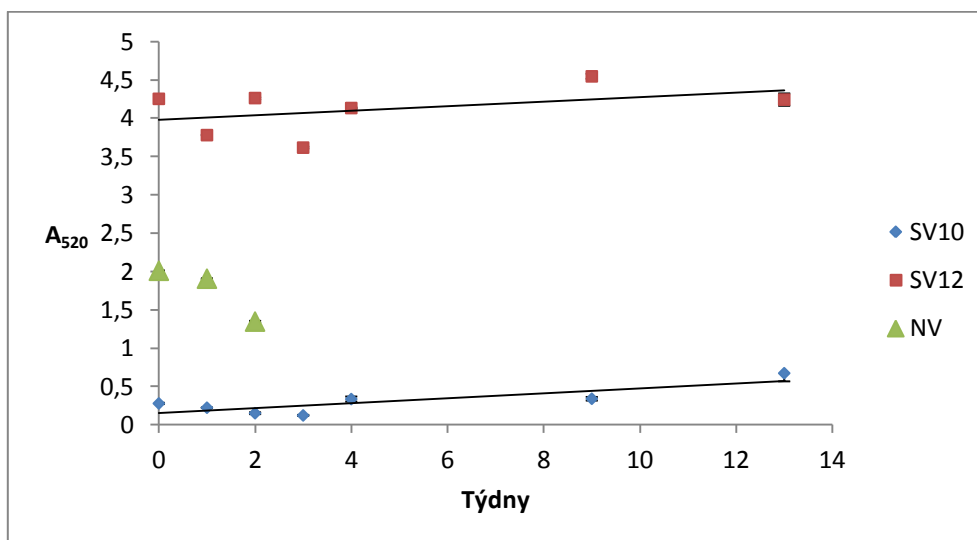
Koncentrace kopigmentujících anthokyanů u vzorku SV10 byla na počátku vysoká, její hodnota se blížila 3,0 a během stárnutí klesala na hodnotu menší než 2,0.

Z obrázku 39 je vidět prudký pokles kopigmentujících anthokyanů z hodnoty 2,0 na 0,2 (SV10 uchovaný za laboratorní teploty). U vzorku SV12 uskladněného za laboratorní teploty nebyly zjištěny přítomné kopigmentující anthokyaniny, stejně tomu bylo i u vzorku NV.

Tabulka č. 8: Procentuální zastoupení kopigmentujících anthokyanů (%)

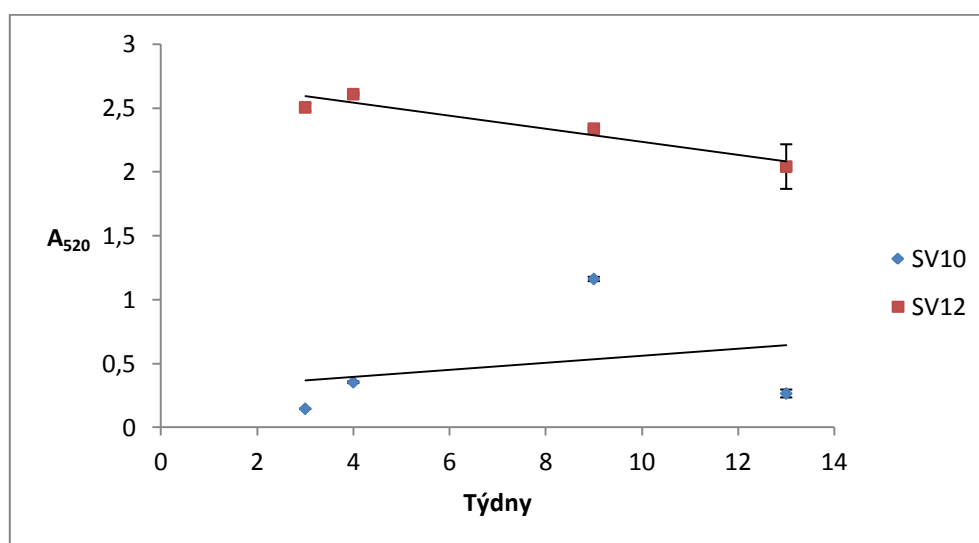
Stárnutí v týdnech	Nesířené víno	2010	2010 v teple	2012	2012 v teple
0.	-	72,2	-	6,10	-
1.	-	57,0	-	7,82	-
2.	-	70,9	-	3,10	-
3.	-	67,1	63,5	-	-
4.	-	62,4	63,6	3,20	-
9.	-	63,9	29,1	1,20	-
13.	-	52,1	6,60	-	-

Z tabulky č. 8 je patrný pokles kopigmentujících anthokyanů. Vzorek SV10 jich obsahuje viditelně více než SV12, v tomto vzorku došlo zcela k jejich zreagování, jak je vidět u vína uskladněného za laboratorní teploty.



Obr. 40: Koncentrace monomerních anthokyanů u vzorků SV10, SV12, NV uchovaných v chladu

Nejnižší koncentrace monomerních anthokyanů je u vzorku SV10. Jejich množství v průběhu stárnutí mírně narostlo z hodnoty kolem 0,2 na 0,5. U vzorku NV byl zaznamenán viditelný pokles těchto látek, z hodnoty 2,0 na menší než 1,5. Nejvyšší koncentrace monomerních anthokyanů, vzhledem k ostatním vzorkům, byla stanovena u vína SV12, (zde nebyl pozorován žádný trend klesání nebo nárůstu těchto látek).



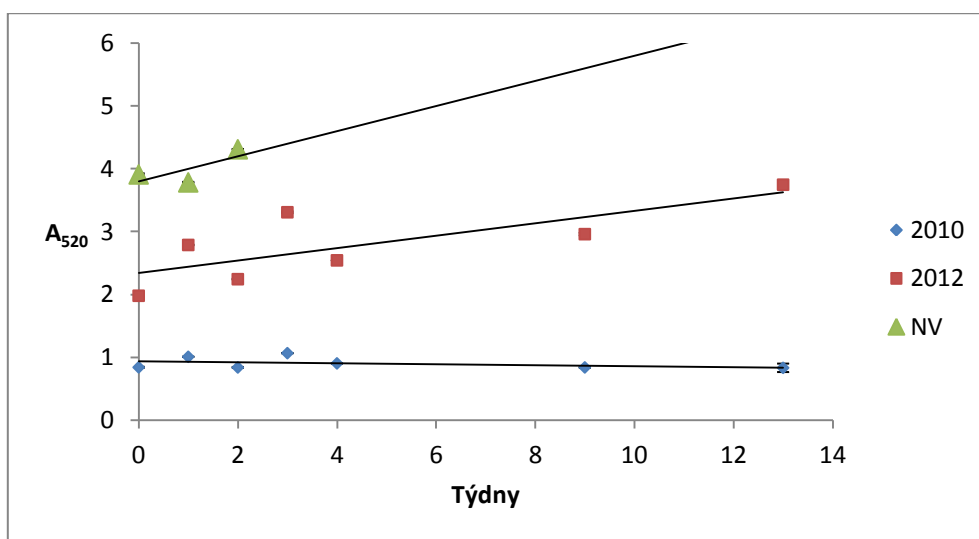
Obr. 41: Koncentrace monomerních anthokyanů u vzorků SV10 a SV12 uchovaných za laboratorní teploty

Tabulka č. 9: Procentuální zastoupení monomerních antokyanů (%)

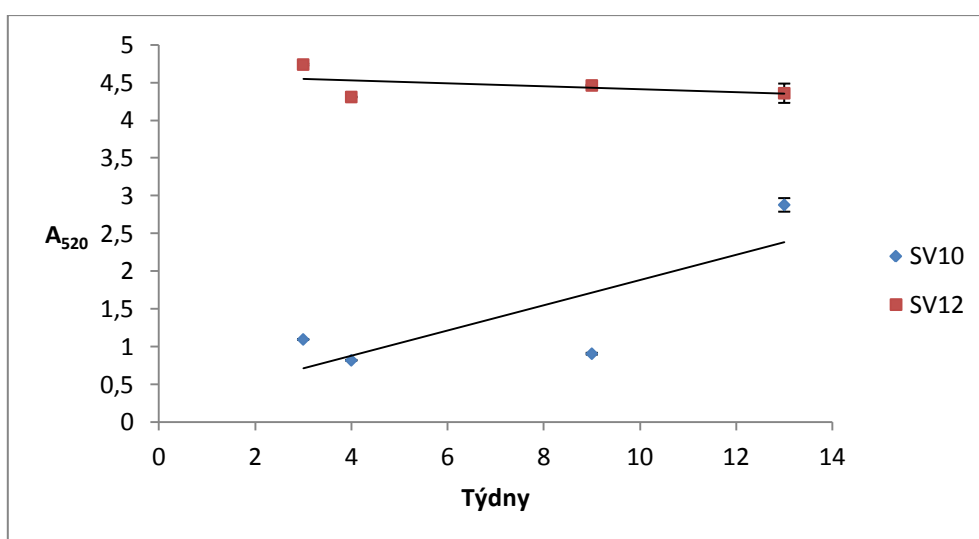
Stárnutí v týdnech	Nesířené víno	2010	2010 v teple	2012	2012 v teple
0.	34,6	6,80	-	64,4	-
1.	36,1	7,50	-	53,2	-
2.	24,7	4,50	-	63,4	-
3.	-	3,43	4,30	53,4	35,2
4.	-	10,2	11,1	59,9	37,8
9.	-	10,4	39,9	59,8	34,0
13.	-	21,5	7,9	57,9	32,4



Procentuální zastoupení monomerních anthokyanů potvrzuje jejich množství zobrazené na obrázcích 40 a 41. U vzorku SV10 je zaznamenán nárůst z 6,8 % na konečných 21,5 % (uchování v chladu). Koncentrace monomerů u vzorku SV12 klesala z hodnoty 64,4 % na 57,9 %.



Obr. 42: Koncentrace polymerních anthokyanů u vzorků SV10, SV12, NV uchovaných v chladu



Obr. 43: Koncentrace polymerních anthokyanů u vzorků SV10 a SV12 uchovaných za laboratorní teploty

Nejnižší koncentrace polymerních anthokyanů byla stanovena u vzorku SV10, jejich zastoupení se pohybovalo okolo hodnoty 1,0. Toto pozorování vychází i z hodnot kopigmentujících anthokyanů, kterých bylo oproti ostatním vzorkům vysoké množství a z koncentrací monomerních, kterých bylo naopak málo (uchování v chladu). U vzorku uskladněného za laboratorní teploty byl pozorován trend nárůstu polymerů z hodnoty 0,5 na 2,5.

Vzorek SV12 obsahoval vyšší množství polymerních anthokyanů a jejich koncentrace narůstala během stárnutí (2,0→3,0, uchování v chladu). Při uskladnění za laboratorní teploty k výrazným změnám nedošlo.

Nejvyšší koncentrace polymerních anthokyanů byla pozorována u nesířeného vína a jejich množství během stárnutí pomalu narůstalo. Tento trend souvisí s poklesem monomerních (obr. 40).

Tabulka č. 10: Procentuální zastoupení polymerních anthokyanů (%)

Stárnutí v týdnech	Nesířené víno	2010	2010 v teple	2012	2012 v teple
0.	67,3	20,8	-	29,1	-
1.	71,7	34,7	-	39,1	-
2.	79,3	24,4	-	33,4	-
3.	-	29,3	32,1	48,9	66,7
4.	-	27,4	25,4	36,8	62,5
9.	-	25,7	31,0	39,0	66,0
13.	-	26,5	85,5	51,1	69,2

U všech vzorků byl zaznamenán nárůst polymerních anthokyanů od počáteční analýzy. Výraznější byl u vín uchovaných za laboratorní teploty.

Tabulka č. 11: Koncentrace celkových anthokyanů

Stárnutí v týdnech	Nesířené víno	2010	2010 v teple	2012	2012 v teple
0.	5,80	4,03	-	6,63	-
1.	5,25	2,91	-	7,12	-
2.	5,44	3,40	-	6,72	-
3.	-	3,60	3,39	6,74	7,11
4.	-	3,30	3,21	6,90	6,90
9.	-	3,26	2,91	7,59	6,75
13.	-	3,13	3,37	7,33	6,32

Koncentrace celkových anthokyanů během měření kolísala. Jejich pokles byl zaznamenán u vzorku SV10 uchovaného jak v chladu (4,03→3,13), tak v teple (4,03→3,37). Naproti tomu, u vína SV12 byl pozorován mírný nárůst, při uskladnění v chladu (6,63→7,33). V teple došlo u tohoto vzorku k poklesu celkových anthokyanů (6,63→6,32). U nesířeného vína nelze popsat trend poklesu či nárůstů, vzhledem k nedostatku měření.

## **8. DISKUSE**

### **8.1. Svatovavřinecké víno, ročník 2010**

Barva tohoto vzorku byla po otevření lahve cihlově červená. Ve srovnání s ostatními vzorky byla nejsvětlejší. Barva vína je dána odrůdou, obsahem anthokyanů, a dalšími enologickými podmínkami a zpracováním hroznů.

V tomto vzorku byla stanovena nejnižší koncentrace celkových anthokyanů (tab. 11), to by odpovídalo velmi světlému zabarvení tohoto vína, jehož hodnota L byla vysoká a stupeň odstínu červené barvy ( $a^*$ ) naopak nízký. Toto pozorování koreluje i se stanovenou hodnotou barevné hustoty, která byla ve srovnání s ostatními vzorky malá. Podobné závěry byly pozorovány i v práci [40], která ale analyzovala jiné odrůdy.

Stárnutím za přístupu vzdušného  $O_2$  se barva měnila, byla tmavší oproti původnímu vzorku, což je patrné z naměřených hodnot L,  $a^*$ ,  $b^*$  (obr. 22 a 23, tab. 2). Toto pozorování bylo potvrzeno i další metodou, na stanovení barevné hustoty a odstínu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 3 a na obrázcích 24, 25.

Barva červeného vína byla ovlivněna vzdušným  $O_2$ , který urychlil chemické procesy probíhající ve víně, za vzniku stabilnějších barevných polymerů, a tím vzrostla intenzita barvy. Toto pozorování se shoduje i s výsledky du Toita a spol. [26], který se zabýval procesem mikro-oxygenace v červených vínech.

Množství kopigmentujících anthokyanů (obr. 38) bylo vysoké oproti vínu bez  $SO_2$  a vzorku SV12. Toto pozorování může odpovídat světlé barvě vína, ve kterém ještě nedošlo k polymerizačním a kondenzačním reakcím za vzniku stabilní a intenzivnější barvy. Těmto reakcím mohlo být zabráněno nadměrným obsahem  $SO_2$ , který bránil reakcím s dalšími sloučeninami. Stárnutím se obsah kopigmentujících anthokyanů postupně snižoval, nejvýraznější pokles byl patrný u vzorků uchovaných za laboratorní teploty (obr. 39). Tento pokles tak ovlivnil barvu červeného vína, která stárnutím byla intenzivnější a tmavší. Toto pozorování se shoduje i s výsledky v literatuře [44].

Oxid siřičitý se přidává do vína jako antioxidační činidlo. Světlá barva tohoto vzorku vína, mohla být způsobena jeho nadbytkem. Díky tomu by došlo k reakci mezi ním a monomery anthokyanů, za vzniku bezbarvých komplexů, na pozici C4 flavyliového kationtu nebo atakem molekuly H<sub>2</sub>O na pozici C2 [14]. Tato reakce by zabránila vzniku polymerních anthokyanů, (to by odpovídalo nízkým hodnotám jejich koncentrací vzhledem k dalším vzorkům, obr. 42), a tím i tmavší barvě červeného vína [15].

Antioxidační aktivita se v průběhu stárnutí měnila, docházelo k jejímu kolísání (tab. 7). Je dána množstvím fenolických látek vyskytujících se ve víně, ale jejich koncentrace v průběhu měření také kolísala. Tyto změny v koncentracích, u obou parametrů, mohly být způsobeny mechanicky při odebírání vzorku. Víno má v každé části jinou hustotu, podle místa odběru tak mohlo dojít k různým změnám v koncentracích fenolických látek a tím i k rozdílným hodnotám antioxidační aktivity.

Během měření docházelo ke snižování celkových anthokyanů a fenolických látek. Toto snížení je dáno oxidací fenolických látek, kdy vzniká i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, který oxiduje ethanol na acetaldehyd, který vytváří můstek mezi anthokyanem a fenolickými sloučeninami, tím vznikne pigment, který je barevný a dojde ke zvýšení barevné hustoty [31].

## 8.2. Svatovavřínecké víno, 2012

Barva vína byla na začátku analýzy tmavě červená (byl to nejtmaší vzorek, obr. 22, 23). Během stárnutí docházelo k ustálení barvy, klesalo množství kopigmentujících anthokyanů (obr. 38) a tím se i posouvalo absorpční maximum. Tento proces popisuje ve své práci Boulton [27]. U vzorku uchovaného za laboratorní teploty došlo ke změně barvy až na modro-fialovou, tomu by odpovídala hodnota b\*, která byla záporná (tab. 2).

Množství celkových anthokyanů během stárnutí klesalo (u vzorku uchovaného v teple, tab. 11). S tím souvisí i pokles monomeru malvidin-3-glukosidu (obr. 30, 31). Bylo to způsobeno polymerizačními reakcemi, při kterých reagují

monomerní anthokyaniny s dalšími složkami vína, za vzniku nových pigmentů, které mají stabilnější barvu proti působení  $\text{SO}_2$  a jiným vnějším vlivům. Výskyt nových látek ve vínu je vidět na chromatogramu po 13 týdnech měření (obr. 31). Tomuto pozorování odpovídá i zvýšení hodnoty barevné hustoty (obr. 24) a odstínu (tab. 3) a snížení hodnoty parametru L (obr. 22). Podobná pozorování byla i v pracích [31], [44].

Koncentrace celkových fenolických látek během měření kolísala (tab. 6). Jak popisuje du Toit a spol. [26], [31], množství celkových fenolických látek klesalo v závislosti na typu odrůdy a vlivu kyslíku. Snížená koncentrace mohla být způsobena oxidací (vzdušným kyslíkem) za vzniku  $\text{H}_2\text{O}_2$ , který oxiduje všudypřítomný ethanol na acetaldehyd, který vytváří můstek pro zprostředkovanou kondenzační reakci, za vzniku stabilního barevného produktu [26]. V případě vzorku SV12 může být kolísání způsobeno mechanicky, špatně provedenou metodou nebo odebíráním vzorku z míst o různých koncentracích. Zvýšení je možno pouze během procesu uskladnění v dubových sudech, ze kterých se uvolňují taniny do vína a to má za následek navýšení celkových fenolických látek [31].

Ve vzorku SV12 byla stanovena vyšší antioxidační aktivita než ve vzorku SV10. Ukazuje to, že ve SV12 je zastoupeno více anthokyanů a fenolických látek oproti SV10.

### 8.3. Víno bez $\text{SO}_2$

Předpokládaný ročník tohoto vína je 2010, rok stáčení byl 2010. Na začátku analýzy byl vzorek tmavě červený-vínový a během stárnutí docházelo k jeho tmavnutí.

Barva tohoto vína se blížila hodnotami L,  $a^*$ ,  $b^*$  vzorku SV12. Během průběhu měření docházelo, stejně jako u vzorků SV10 a SV12, k navýšení barevné hustoty a tím i k tmavšímu zabarvení.

Ke zvýšení barevné hustoty přispívají i kopigmentační reakce, které ale probíhají hlavně v mladých vínech [27]. V nesířeném víně nebyl zaznamenán výskyt

kopigmentujících sloučenin, takže z toho lze usoudit, že toto víno mohlo být staršího ročníku nebo zde došlo rychleji ke kopigmentačním reakcím, vzhledem k tomu, že tento vzorek neobsahoval SO<sub>2</sub> jako antioxidační činidlo a bylo tak náchylnější oxidačním vlivům.

Během stárnutí došlo ke snížení monomerních anthokyanů a k nárůstu polymerních, jejichž koncentrace byla nejvyšší vzhledem k ostatním vzorkům (tab. 10). Důvody, proč k těmto reakcím dochází, jsou již zmíněny výše.

U nesířeného vína se lišily záznamy chromatogramů oproti vzorkům Svatovavříneckých vín (obr. 26, 27). Docházelo zde k eluci dříve, lze tedy předpokládat, že látky odpovídající těmto píkům, byly hydrofilnější než standard malvidin-3-glukosid, který měl retenční čas v 15. minutě. Polárnějším derivátem mv-3-glc by mohl být malvidin-3,5-diglukosid (malvin), který se ale vyskytuje pouze v divokých (hybridních) odrůdách *Vitis vinifera* [51]. V práci [52] je ukázka chromatogramu s malvidinem-3-glukosidem a malvinem, ve kterém je vidět, že malvin eluuje v dřívějším čase než mv-3-glc. Z toho můžeme usoudit, že toto domácí víno mohlo být vyrobeno z divoké odrůdy *Vitis vinifera*.

## **9. ZÁVĚR**

V průběhu analýzy byly sledovány změny barvy vína během jeho stárnutí u třech vzorků, které se mezi sebou lišily barvou i chemickým složením. Během měření byly stanoveny změny barvy, které byly nejvýraznější u vzorku SV10. Stanovením ostatních parametrů, které souvisí se změnou barvy, jako je množství anthokyanů a fenolických látek ve víně, bylo dokázáno, že během stárnutí dochází k jejich poklesu, který se projeví jako tmavší barva červeného vína.

K dispozici byl i vzorek nesířené vína. Vzhledem k dosaženým výsledkům a srovnáním s různými publikacemi, lze říci, že přítomnost SO<sub>2</sub> ve víně není nutná, pokud se v dané odrůdě a poté i ve víně vyskytuje dostatečné množství antokyanů, které reaguje s ostatními fenolickými sloučeninami za vzniku stabilních barevných derivátů, které jsou odolnější působení vnějších vlivů.



## **10. LITERATURA**

- [1] Vacková, T.: *Biochemické parametry vína a jejich změny během stárnutí*, Bakalářská práce, katedra biochemie PŘF UK, Praha 2011
- [2] Laho, L., Minárik, E.: *Vinárstvo II*. SNTL, Bratislava 1959
- [3] Kraus, V., Hubáček, V., Ackermann, P.: *Rukověť vinaře*. Nakladatelství Brázda, Praha 2010
- [4] Farkaš, J.: *Technologie a biotechnologie vína*. NTL, Bratislava 1980
- [5] Soleas, G. J., Diamandis, E. P., Goldberg, D. M.: *J. Clin. Lab. Anal.* 11:287-313 (1997)
- [6] Pavloušek, P.: *Výroba vína u malovinařů*. Grada Publishing a.s., Praha 2006
- [7] Margalit, Y.: *Concepts in Wine Chemistry*, 3. vydání. Wine Apprec. Guild, San Francisco 2012,
- [8] Zamora, F.: *Biochemistry of Alcoholic Fermentation*. V knize: *Wine Chemistry and Biochemistry* (Moreno-Arribas, M., Polo, M. C., eds.), 3-26, Springer Science 2009
- [9] Downey, M. O., Dokoozlian, N. K., Krstic, M. P.: *Am. J. Enol. Vitic.* 57:3 (2006)
- [10] Villiers, A., Vanhoenacker, G., Majek, P., Sandra, P.: *J. Chromatogr. A* 1054 (2004) 195-204
- [11] [http://web.vscht.cz/~koplkr/Rostlinné fenoly a flavonoidy.pdf](http://web.vscht.cz/~koplkr/Rostlinné_fenoly_a_flavonoidy.pdf), staženo 10.5 2013
- [12] Volf, K., Andrs, F.: *Flavonoidy a jejich biologické působení*. JuWital s.r.o., Praha 2008
- [13] Hess, D.: *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha 1983
- [14] Terrier, N., Pancet-Legrand, C., Cheynier, V.: *Flavanols, Flavonols and Dihydroflavonols*. V knize: *Wine Chemistry and Biochemistry* (Moreno-Arribas, M., Polo, M. C., eds.), 463-508, Springer Science 2009

- [15] <http://www.etslabs.com>, staženo 12.4. 2013
- [16] [www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/p/P\\_27C.doc](http://www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/p/P_27C.doc) staženo 17.8. 2013
- [17] Li, H., Guo, A., Wang, H.: *Food Chem.* 108 (2008) 1-13
- [18] Morel-Salmi, C., Souque, J. M., Bes, M., Cheynier, V.: *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 4270-4276
- [19] [en.wikipedia.org/wiki/Ellagic\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Ellagic_acid), staženo 20.6. 2013
- [20] Edwin, H.: *Phytochemistry* 19 (1980) 2577-2582
- [21] López, R. S., Fernández-Zurbano, P., Tena, M. T.: *J. Chromatogr. A* 1052 (2004) 191-197
- [22] Caridi, A., Cufari, A., Lovino, R., Palumbo, R., Tedesco, I.: *Food Technol. Biotechnol.* 42 (2004) 37-40
- [23] Ovando, A. C., Pacheco-Hernández, M. L., Páez-Hernández, E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A.: *Food Chem.* 113 (2009) 859-871
- [24] Dalls, C., Ricardo-da-Silva, J. M., Laureano, O.: *Vitis* 34 (1995) 51-56
- [25] Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M.: *Anal. Chim. Acta* 458 (2002) 15-27
- [26] Toit, W. J., Lisjak, K., Marais, J., Toit, M.: *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 27 (2006)
- [27] Boulton, R.: *Am. J. Enol. Vitic.* 52:2 (2001)
- [28] Salas, E., Atanasova, V., Poncet-Legrand, C., Meudec, E., Mazauric, J. P., Cheynier, V.: *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 325-332
- [29] Salas, E., Le Guernevé, Ch., Fulcrand, H., Poncet-Legrand, C., Cheynier, V.: *Tetrahedron Lett.* 45 (2004) 8725-8729
- [30] Somers, T. C., Evans, M. E.: *Vitis* 25 (1986) 31-39
- [31] Toit, W. J.: *The effect of oxygen on the composition and microbiology of red wine*, Disertační práce, Stellenbosch University, 2006

- [32] Atanasova, V., Fulcrand, H., Le Guernevé, Ch., Cheynier, V., Moutounet, M.: *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 6151-6153
- [33] Vivar-Quintana, A. M., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C.: *Anal. Chim. Acta* 458 (2002) 147-155
- [34] Klejdus, B.: *Separace a identifikace isoflavonů v rostlinném materiálu*, Habilitační práce, katedra analytické chemie, Univerzita Palackého v Olomouci, 2004
- [35] Koyama, K., Ikeda, H., Poudel, P. R., Goto-Yamamoto, N.: *Phytochemistry* 78 (2012) 54-64
- [36] Kindl, H., Weber, G.: *Biochemie rostlin*. Academia, Praha 1981, 1. Vydání
- [37] Kornberg, H. L., Phillips D. C.: *Plant Biochemistry*. London 1974
- [38] Kindl H.: *Biochemie der Pflanzen*, 2. vydání. Springer Verlag, Berlín 1987
- [39] <http://www.brenda-enzymes.org/>, poslední přihlášení 5.8. 2013
- [40] *HPLC Determination of nine major anthocyanins in red and rosé wine* in Compendium of International Methods of Analysis-OIV, Anthocyanins, 2007
- [41] *Determination of chromatic characteristics according to CIElab* in Compendium of International Analysis of Methods-OIV, Chromatic Characteristics, 2006
- [42] <http://brucelindbloom.com/>, poslední přihlášení 1.6. 2013
- [43] Gao, L., Girard, B., Mazza, G., Reynolds, A. G.: *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 2003-2008
- [44] Cliff, M. A., King, M. C., Schlosser, J.: *Food Res. Int.* 40 (2007) 92-100
- [45] Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., Ewert, B.: *J. Agric. Food Chem.* 47 (1997) 4009-4017
- [46] Glories, Y.: *Recherches sur la matière courante des vins rouge*, Disertační práce, L'Université de Bordeaux II, Francie 1978

- [47] Peng, Z., Iland, P. G., Oberholster, A., Sefton, M. A., Waters, E. J.: *Austr. J. Grape and Wine Res.* 8 (2002) 70-75
- [48] Hajj, Y. E., Louka N., Nguyen, C., Maroun, R. G.: *Food Nutr. Sci.* 3 (2012) 89-103
- [49] Dobšíčková, S.: *Stanovení antioxidantů ve víně*, Diplomová práce, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010
- [50] Luque-Rodríguez, J. M., Luque de Castro, M. D., Pérez-Juan, P.: *Bioresource Technol.* 98 (2007) 2705-2713
- [51] Pavloušek, P.: *Pěstování révy vinné*. Grada Publishing a.s., Praha 2011
- [52] Quirós, A. R. B., López-Henández, J., Lage-Yusty, M. A.: *Open Food Sci. J.* 2 (2008) 68-71