

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2020

Bc. Pavel Šmejda

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Porovnání aroma profilu konvenčně vyrobených a naturálních bílých vín
Diplomová práce

2020

Bc. Pavel Šmejda

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Pavel Šmejda**
Osobní číslo: **C18442**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Porovnání aroma profilu konvenčně vyrobených a přírodních bílých vín**
Žadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Proveďte literární rešerši zaměřenou na stanovení aroma profilu vína metodou plynové chromatografie.
2. V experimentální části nalezněte vhodné podmínky pro extrakci těkavých sloučenin s využitím mikroextrakce na tuhou fázi. Porovnejte aroma profil konvenčně vyrobených a přírodních bílých vín.
3. Dosazené výsledky zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tiskněná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Tomáš Bajer, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

LS.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1. 7. 2020

Bc. Pavel Šmejda

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce Ing. Tomáši Bajerovi, Ph.D. za vedení v průběhu celé práce. Poděkování patří i doc. Ing. Petře Bajerové, Ph.D. za konzultace a dále celé Katedře analytické chemie Univerzity Pardubice za výuku odborných předmětů.

A speciální poděkování patří manželce.

ANOTACE

Předmětem diplomové práce je stanovení aroma profilu bílých vín. V teoretické části je shrnuta technologie výroby bílých vín od sklizně hroznů, úpravy před fermentací, vlastní alkoholová fermentace a zrání vína. V jednotlivých krocích jsou uvedeny faktory, které mohou ovlivňovat výsledný aroma profil hotového vína. Je popsán rozdíl mezi konvenčně vyráběnými a naturálními víny. Následuje popis chemického složení vína rozdělený na jednotlivé skupiny látek a možnosti extrakce těkavých látek ze vzorku vína. V experimentální části je vyvinutý postup extrakce těkavých látek z vína metodou mikroextrakce na tuhou fázi s následnou analýzou plynovým chromatografem s plamenově-ionizační a hmotnostní detekcí. Optimalizovanou metodou bylo změřeno 78 vzorů konvenčních a naturálních vín. Na naměřených datech bylo provedeno statistické vyhodnocení a byl diskutován model pro rozlišení konvenčních a naturálních vín na základě aroma profilu vína.

KLÍČOVÁ SLOVA

Aroma profil vína, těkavé látky, mikroextrakce na tuhou fázi, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, ortogonální projekce do latentních struktur.

TITLE

Comparison of aroma profiles for white wines produced by conventional and natural methods

ANNOTATION

The subject of the thesis is to determine the aroma profile of white wines. The theoretical part summarizes the technology of white wine production from grape harvest, treatment before fermentation, alcoholic fermentation and wine maturation. The individual steps list the factors that may affect the resulting aroma profile of the finished wine. The difference between conventionally produced and natural wines is described. The following is a description of the chemical composition of wine divided into individual groups of substances and the possibility of extracting volatile substances from a wine sample. In the experimental part is developed a procedure for the extraction of volatile substances from wine by the method of solid phase microextraction with subsequent analysis by gas chromatograph with flame ionization and mass detection. 78 samples of conventional and natural wines were measured by the optimized method. A statistical evaluation was performed on the measured data and a model for distinguishing between conventional and natural wines based on the aroma profile of the wine was discussed.

KEYWORDS

Aroma profile of wine, volatile substances, solid phase microextraction, gas chromatography, mass spectrometry, orthogonal projection into latent structures.

OBSAH

ANOTACE.....	7
KLÍČOVÁ SLOVA	7
TITLE	8
ANNOTATION.....	8
KEYWORDS	8
OBSAH	9
SEZNAM A TABULEK.....	13
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	14
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	15
SEZNAM PŘÍLOH	17
ÚVOD	17
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	18
1.1 Historie výroby vína.....	18
1.2 Výroba bílých vín konvenční metodou	19
1.2.1 Příprava moštu.....	19
1.2.1.1 Sklizeň hroznů.....	19
1.2.1.2 Odstopkování a drcení bobulí.....	20
1.2.1.3 Naležení rmutu před lisováním	21
1.2.1.4 Lisování.....	21
1.2.1.5 Přidavky oxidu siřičitého	22
1.2.1.6 Odkalování moštu.....	22
1.2.2 Alkoholová fermentace.....	23
1.2.2.1 Kvasinky	23
1.2.2.2 Průběh růstu kvasinek během kvašení moštu.....	25
1.2.2.3 Faktory ovlivňující alkoholové kvašení.....	26
1.2.2.4 Kontrola průběhu kvašení	28
1.2.3 Školení vína.....	30
1.2.3.1 Stáčení vína	30
1.2.3.2 Přídavek oxidu siřičitého.....	31
1.2.3.3 Číření vína.....	31
1.2.3.4 Filtrace	31
1.2.4 Zrání vína	32
1.2.4.1 Zrání vína na kvasničných kalech.....	32

1.3	Výroba červených vín konvenční metodou	32
1.4	Výroba naturálních vín	32
1.4.1	Biovína a biodynamická vína	33
1.4.2	Naturální a autentická vína	34
1.4.3	Oranžová vína	35
1.5	Chemické složení vína	36
1.5.1	Alkoholy	36
1.5.1.1	Etanol	36
1.5.1.2	Metanol	37
1.5.1.3	Vyšší alkoholy	37
1.5.1.4	Terpenové alkoholy	37
1.5.1.5	Polyalkoholy	38
1.5.1.6	Dioly	38
1.5.1.7	Polyoly	38
1.5.2	Sacharidy	39
1.5.2.1	Monosacharidy pentózy	39
1.5.2.2	Monosacharidy hexózy	39
1.5.2.3	Oligosacharidy	39
1.5.2.4	Polysacharidy	40
1.5.3	Dusíkaté sloučeniny	40
1.5.3.1	Amoniakální dusík	40
1.5.3.2	Aminokyseliny	40
1.5.3.3	Peptidy	41
1.5.4	Vitaminy	41
1.5.5	Minerální látky	41
1.5.6	Kyseliny	41
1.5.6.1	Těkavé kyseliny	42
1.5.6.2	Netěkavé kyseliny	42
1.5.7	Fenolové sloučeniny	42
1.5.7.1	Fenolové kyseliny a jejich deriváty	43
1.5.7.2	Flavonoidy	43
1.5.7.3	Antokyany	43
1.5.7.4	Třísloviny	44
1.5.7.5	Polyfenoly vína a jejich vliv na zdraví	44
1.5.8	Estery	45
1.5.8.1	Biologická esterifikace	45

1.5.8.2	Chemická esterifikace	45
1.6	Extrakce těkavých látek	46
1.6.1	Extrakce kapalina-kapalina	46
1.6.2	Extrakce tuhou fází	46
1.6.3	Mikroextrakce na tuhou fází SPME	47
1.6.4	Další možnosti extrakce	49
1.7	Stanovení těkavých látek aroma vína metodou plynové chromatografie.....	50
1.7.1	Plynová chromatografie.....	50
1.7.1.1	Konstrukce plynového chromatografu.....	51
1.7.1.2	Plamenový ionizační detektor	52
1.7.1.3	Tepelně vodivostní detektor	52
1.7.1.4	Hmotnostní spektrometr.....	53
1.7.2	Headspace vzorkování	53
1.7.2.1	Dynamický headspace.....	54
1.7.2.2	Statický headspace.....	54
1.7.2.2.1	Statický headspace s plynotěsnou stříkačkou	54
1.7.2.2.2	Statický headspace metodou mikroextrakce na tuhou fází (HS-SPME)	55
1.7.2.2.3	Statický headspace metodou vyrovnaného tlaku.....	55
1.7.2.2.4	Statický headspace s dávkovací smyčkou	56
1.7.3	Olfaktometrická analýza	56
1.8	Statistická analýza dat	58
1.8.1	Optimalizace podmínek extrakce	58
1.8.2	Interpretace vztahů mezi naměřenými soubory dat.....	59
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	60
2.1	Vzorky a chemikálie.....	60
2.1.1	Vzorky bílých vín	60
2.1.2	Použité chemikálie.....	64
2.2	Mikroextrakce tuhou fází v headspace uspořádání	64
2.2.1	Volba typu sorbentu SPME vlákna	64
2.2.2	Optimalizace úpravy vzorků před extrakcí	64
2.3	Plynová chromatografie.....	65
2.3.1	Podmínky GC-FID	65
2.3.2	Podmínky GC-MS	65
2.3.3	Opakovatelnost měření	66
2.3.4	Porovnání retenčních časů přímým nástřikem a headspace SPME technikou.....	66
3	Výsledky a diskuze	67

3.1	Analýza aroma profilu vína	67
3.2	Optimalizace teploty a doby extrakce metodou SPME	67
3.3	Postup vyhodnocení vzorků změřených metodou GC-FID	71
3.4	Rozlišení konvenčně a naturálně vyrobených vín statistickou analýzou profilu těkavých látek	74
3.4.1	Příprava dat pro statistické hodnocení modelem OPLS	74
3.4.2	Tvorba kalibračního modelu	75
3.4.3	Validace kalibračního modelu	79
3.5	Postup identifikace významných látek	81
4	ZÁVĚR	86
	POUŽITÁ LITERATURA	87
	PŘÍLOHY	90

SEZNAM A TABULEK

Tabulka 1: Potřeba zahřívání a chlazení během vinifikace.....	29
Tabulka 2: Základní charakter vín v závislosti na teplotě kvašení.....	30
Tabulka 3: Limity obsahu celkového oxidu siřičitého v jednotlivých typech biovín dle prováděcího nařízení č. 203/2012.....	34
Tabulka 4: Průměrný obsah těkavých látek ve víně.....	36
Tabulka 5: Hodnoty fenolových sloučenin ve víně.....	43
Tabulka 6: Typy stacionárních fází SPME, extrakční mechanismus a polarita.....	48
Tabulka 7: Seznam vzorků a zastoupení odrůd.....	62
Tabulka 8: Optimalizace přípravy vzorku pro měření.....	65
Tabulka 9: Optimalizace teploty a času extrakce.....	68
Tabulka 10: Retenční časy <i>n</i> -alkanů z dat GC-FID s retenčními indexy pro vzorky 1–30, 36–45.....	72
Tabulka 11: Retenční časy <i>n</i> -alkanů z dat GC-FID s retenčními indexy pro vzorky 31–35, 46–50 72	
Tabulka 12: Retenční časy <i>n</i> -alkanů z dat GC-FID s retenčními indexy pro vzorky 51–60 ...	73
Tabulka 13: Retenční časy <i>n</i> -alkanů z dat GC-FID s retenčními indexy pro vzorky 61–78 ...	73
Tabulka 14: Hodnoty korelačního koeficientu pro statistický model.....	81
Tabulka 15: Retenční časy <i>n</i> -alkanů z dat GC-MS s retenčními indexy pro vzorky 1–30, 36–45..	83
Tabulka 16: Retenční časy <i>n</i> -alkanů z dat GC-MS s retenčními indexy pro vzorky 31–35, 46–50	83
Tabulka 17: Retenční časy <i>n</i> -alkanů z dat GC-MS s retenčními indexy pro vzorky 51–60....	84
Tabulka 18: Retenční časy <i>n</i> -alkanů z dat GC-MS s retenčními indexy pro vzorky 61 - 78 ..	84
Tabulka 19: Tabulka identifikovaných těkavých látek z obou druhů vín metodou GC-MS ...	85

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma dílčích chemických reakcí v kvasinkové buňce	24
Obrázek 2: Růstová křivka kvasinky	26
Obrázek 3: Kvevri - tradiční gruzínská nádoba z pálené hlíny na výrobu vína	35
Obrázek 4: Plynový chromatograf model 154-B výrobce PerkinElmer z roku 1956.....	50
Obrázek 5: Headspace technika metodou vyrovnaného tlaku	56
Obrázek 6: Schéma konfigurace instrumentace pro olfaktometrickou analýzu.....	57
Obrázek 7: Sestava zařízení pro olfaktometrickou analýzu	58
Obrázek 8: Optimalizace teploty a času extrakce na kombinaci maximálního počtu a plochy píků	69
Obrázek 9: Graf vhodnosti počtu a plochy píků v projekci 3D.....	70
Obrázek 10: Graf vhodnosti pro počet a plochu píků v projekci 2D.....	70
Obrázek 11: Graf Hottelingovy statistiky výsledného kalibračního modelu	76
Obrázek 12: Graf skóre kalibračního modelu (software SIMCA)	77
Obrázek 13: Logaritmus pravděpodobnostního poměru (LLR) pro zadané hodnoty k hodnotám predikovaným pro konvenční vína z kalibračního datasetu.....	77
Obrázek 14: Logaritmus pravděpodobnostního poměru (LLR) pro zadané hodnoty k hodnotám predikovaným pro naturální vína z kalibračního datasetu.	78
Obrázek 15: Validace statistického modelu Score Scatter Plot	79
Obrázek 16: Závislost predikovaných hodnot LLR na pozorovaných hodnotách pro konvenční vína na grafu vlevo a naturální vína na grafu vpravo	80

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

CAR	Carboxen
CDD	Central Composite Design - Centrálně kompozitní plánování
CW	Carbowax
DVB	Divinylbenzen
EI	Electron Ionization - Elektronová ionizace
FID	Flame-Ionisation Detector - Plameno ionizační detektor
GC	Gas chromatography - Plynová chromatografie
GC-FID	Gas Chromatography - Flame ionization Detector - Plynová chromatografie s plameno-ionizační detekcí
GC-O	Gas Chromatography-Olfactometry -Plynová chromatografie s detekcí čichem
GCMS	Gas chromatography-Mass Spectrometry - Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HS	Headspace
HS-SPME	Headspace Solid Phase Microextraction - Headspace mikroextrakce na tuhou fázi
LLE	Liquid-Liquid Extraction, extrakce kapalina-kapalina
MS	Mass spectrometry - Hmotnostní spektrometrie
NIPALS	Non-linear Iterative Partial Least Squares - částečné regrese nejmenších čtverců pomocí nelineárního iteračního algoritmu
NIST	National Institute of Standards and Technology
OPLS	Orthogonal Projections to Latent Structures - Ortogonální projekce do latentních struktur
PA	Polyacrylate - polyakrylát
PDMS	Polydimethylsiloxan
RSM	Respond Surface Methodology - Metoda odezvové křivky
SBSE	Stir-Bar Sorptive Extraction - Sorpční extrakce na míchadle

SPE Solid Phase Extraction - Extrakce na tuhou fázi
SPME Solid Phase Microextraction - Mikroextrakce na tuhou fázi

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Chromatogram konvenčního vína VZ34A naměřený metodou GC-FID	90
Příloha 2: Chromatogram přírodního vína VZ50A naměřený metodou GC-FID.....	90
Příloha 3: Chromatogram konvenčního vína VZ34 naměřený metodou GC-MS (5,5–16 min.)	91
Příloha 4: Chromatogram konvenčního vína VZ34 naměřený metodou GC-MS (16 –32 min.)	91
Příloha 5: Chromatogram přírodního vína VZ50 naměřený metodou GC-MS (5,5–16,0 min.)	92
Příloha 6: Chromatogram konvenčního vína VZ50 naměřený metodou GC-MS (16,0–32 min.)	92

ÚVOD

Víno provází lidstvo po tisíce let a je nedílnou součástí jeho kulturních dějin. Víno se pije nejen při běžných setkáních a rodinných oslavách, ale doprovází různé slavnostní a společenské události, používá se pro formální přípitky, je součástí církevních obřadů. Víno není vnímáno jen jako jeden z nápojů s obsahem alkoholu, ale jako součást dějin a kulturní fenomén.

Vinařství a produkce vína spolu s navázaným prodejem vína tvoří nedílnou složku světové ekonomiky. V roce 2018 byla celosvětová plocha vinic 7,4 milionů hektarů s produkcí 77,8 milionů tun hroznů révy vinné. Z toho 57 % tvoří hrozny pro výrobu vína, 36 % produkce pro hroznové víno jako ovoce a 7 % pro hrozinky. V Roce 2019 byla celková světová produkce vína 292 milionů hektolitřů s celosvětovou obchodní hodnotou exportu vína v hodnotě 30 miliard euro [1]. V České republice byla v roce 2018 osázená plocha vinic 18,1 tisíc hektarů, z kterých bylo sklizeno 103,7 tisíc tun hroznů. Výroba vína v České republice byla v objemu 645 tisíc hektolitřů, 2/3 produkce jsou bílá vína, 1/3 produkce červená vína. Celková spotřeba vína v České republice za vinařský rok 2018/2019 byla 2052 tisíc hektolitřů. Vlastní produkcí je v České republice možné pokrýt okolo 30 % spotřeby vína [2].

Kvalita vína je určena jeho celkovými organoleptickými vlastnostmi. V současné době stále neexistuje instrumentální analytická metoda, která by dokázala popsat víno ve stejné komplexnosti, jako senzorická analýza. Senzorická analýza vína je analytická metoda, do které řadíme hodnocení organoleptických znaků: vzhledu, vůně a chuti. Znalec pro senzorické hodnocení vína musí splnit požadavky podle metodiky Ministerstva zemědělství ČR.

Cílem této práce bylo zjištění vhodných podmínek pro stanovení aroma profilu bílých vín metodou plynové chromatografie s plameno-ionizační a hmotnostní detekcí. Jako metoda pro extrakci těkavých látek byla zvolena mikroextrakce na pevnou fázi. Výběr vzorků pro analýzy byl omezen na bílá vína vyprodukovaná v České republice z moravské i české oblasti. Pro větší variabilitu vzorků byly analyzovány vína z konvenční produkce, ale také vína označovaná jako naturální, při jejichž výrobě vinař používá upravené postupy pěstování hroznů a výroby vína. Naturální (autentická, biodynamická) vína nemají legislativně danou definici. Je možné je obecně popsat poptávkou spotřebitelů po víně z šetrného zemědělství s menším množstvím použitých nebo přidaných přípravků ve vinohradě i ve sklepě.

1 TEORETICKÁ ČÁST

V teoretické části diplomové práce bude popsána technologie výroby bílého vína a vliv jednotlivých technologických kroků na výsledný aroma profil. Dále bude popsáno chemické složení vína a skupiny těkavých organických látek přítomných ve vínu. Na závěr budou popsány možnosti stanovení aroma profilu vína metodou plynové chromatografie, včetně extrakce těkavých organických látek.

1.1 Historie výroby vína

Víno, jako nápoj vyráběný spontánní fermentací moštu z bobulí révy vinné (*Vitis vinifera*), provází lidstvo minimálně od 6000 let př. n. l. V Íránu byla nalezena nádoba z keramiky, datována mezi 5400–5000 př.n.l., s přítomností sodné soli kyseliny vinné. Ta je přítomná ve větším množství v hroznech révy vinné a v keři Řečík terebintový (*Pistacia terebinthus*), jehož pryskyřice byla přidávána do vína pro inhibici růstu bakterií [3].

Počátky výroby vína se situují do oblasti Kavkazu s následným rozšířením do Palestiny, Sýrie, Egypta a Mezopotámie. Egypťané, kteří zvládli technologii výroby vína, pěstovali šest až osm odrůd révy vinné. Ve starověku jsou u Sumerů písemné zmínky o révě vinné a vínu vytesané do hliněných tabulek datovaných do 3. tisíciletí př.n.l. V Řecku se vinařství pravděpodobně začalo rozvíjet v období 2000 let př.n.l. a spolu s Féníčany rozšířili poznatky o pěstování vína do oblasti západního Středomoří. Zmínka o révě vinné je i v Bibli, kde je ve Starém zákoně v knize Genesis zapsáno, že Noemova archa skrývala i sazenice révy, protože po vysušení země praotec Noe „obíraje se zemí, začal dělati vinice“ [4, 5].

Také Italové začali pěstovat vinnou révu a vyrábět vlastní víno. Jedním z center vinařství byly Pompeje. Po výbuchu sopky Vesuvu rozšiřovali vinařství po celé říši a postupně zakládali vinice ve svých východních provinciích v oblasti Mosely a Dunaje, které byly základem pro současné vinice v Německu nebo v Rakousku. K širokému rozšíření došlo během 17. století díky použití síry jako konzervačního prostředku v sudech, kterým se podařilo prodloužit trvanlivost vyrobeného vína a možnosti jeho převážení na větší vzdálenosti [5].

V oblasti České republiky se počátky znalosti vinařství datují do období Keltů, kteří mohli vinnou révu donést do oblasti Moravy. Dále jižní část Moravy patřila do oblasti římské provincie, kde měli římscí vojáci základnu pod Pálavou a vysadili zde první révu. Dalším rozšířením vinic probíhalo pod vlivem křesťanství v období Velkomoravské říše, kdy se vinařství rozšiřuje i na české území. Zakladateli vinohradů byly křesťanské kláštery. V 13. a 14. století zakládají vinohrady měšťané z Brna a Znojma, kdy se plochy vinic začaly zvyšovat. V roce

1358 císař Karel IV vydal nařízení o zakládání vinic pro Prahu a české království. V období mezi 15. – 16. stoletím bylo vinařství velice rozvinuté a výměr vinic dosahoval okolo 15 000 ha. V období třicetileté války (1618-1648) dochází k úpadku českého vinařství. V 18. století došlo k postupné obnově vinic. Na Moravě bylo roku 1748 okolo 16 600 ha. V 19. století začala plocha vinic na Moravě klesat na 15 000 ha a v Čechách bylo jen 1 800 ha. V období průmyslové revoluce vzrůstala preference v pití piva a destilátů a zemědělci se zaměřili na pěstování průmyslových plodin, jako cukrová řepa. Po první světové válce došlo k výraznému poklesu plochy vinic na 3 790 ha na Moravě a v Čechách 377 ha. V roce 1949 měly Morava a Čechy celkem 6 200 ha vinic. Větší obnova vinic začala v druhé polovině šedesátých let s rozvojem větších zemědělských družstev [5].

Po změně společenského zřízení v roce 1989 dochází k postupnému rozvoji a renezanzi vinařství. V roce 2004 byl vydán nový zákon o vinohradnictví a vinařství č. 321/2004 Sb. s jeho následnou novelou z roku 2017. Vlivem zlepšující se technologie výroby vína, vzdělávání vinařů a vzrůstající spotřebě vína dochází ke zlepšování kvality produkovaných vín a rozšiřování jejich nabídky.

1.2 Výroba bílých vín konvenční metodou

V této kapitole bude uveden obecný postup výroby bílého vína s popisem jednotlivých technologických kroků a popisem faktorů, které mohou mít vliv na vůni hotového vína. Konvenční metodou je označována technologie výroby vína, která se uplatňuje jako současný výrobní standard pro malé vinaře i průmyslové producenty vína. Popsaná metoda výroby odpovídá moderním učebnicím technologie výroby vína, včetně aktuálních trendů v mechanizaci a automatizaci a používání různých přípravků. Výrobní postupy vinařů se však mohou lišit podle pěstovaných odrůd, ročníku sklizně, druhu vyráběného vína, používané techniky a strojů, zkušeností sklepmistra atd.

1.2.1 Příprava moštu

1.2.1.1 Sklizeň hroznů

Vlastní výroba vína začíná sklizní hroznů z vinné révy. Na výsledné aroma hotového vína mají vliv podmínky a vinohradnické postupy během pěstování révy ve vinohradu, např. odrůda révy, počet hroznů na keř, složení půdy (terroir), vliv počasí v daném roce, zkušenosti vinaře a atp.

Rozhodnutí o počátku sklizně hroznů se provádí na základě fyziologické zralosti hroznů a technologických znaků. Fyziologická zralost se posuzuje senzorycky, hodnocením zabarvení bobulí, jejich konzistence a chuti. Při fyziologické zralosti získá slupka bobule odrůdově

typické vybarvení a u bílých odrůd se bobule stává průhlednou a proti světlu jsou patrná semena vybarvující se do hněda. Bobule postupně měknou, ztrácejí na pružnosti a lehce se oddělují od stopky. Během zrání se snižuje bylinný projev chuti a zvyšuje se typické aroma hroznů dané odrůdy. Technologické znaky se stanovují fyzikálně-chemickými metodami pro zjištění cukernatosti hroznů, dále obsah celkových titrovatelných kyselin, pH moštu. Tyto analýzy se provádí na dostatečně reprezentativním vzorku moštu získaného z odebraných 500 až 800 bobulí, což odpovídá asi 1–1,5 kg. Mezi nejdůležitější faktory pro rozhodnutí o zahájení sklizně z hlediska chemického složení hroznů patří obsah cukrů a kyselin. Minimální cukernatost hroznů je dána legislativou a určuje i budoucí kvalitativní zařazení vína. Spolu s cukernatostí je také důležitý obsah kyselin (kys. jablečná a vinná a jejich vzájemný poměr), který ovlivňuje následné technologické kroky a podílí se na chuti vína. Cukernatost se ve vinařství měří skleněným areometrem, který stanoví hloubkou svého rovnovážného ponoru v měřené kapalině za předepsaných podmínek její hustotu (hustoměry) nebo přímo obsah zkvasitelných cukrů v hroznovém moštu (moštoměry). V české republice se nejčastěji používá areometr označovaný jako normalizovaný moštoměr. Jeden stupeň °NM udává, kolik kilogramů zkvasitelných cukrů je v 100 litrech moštu. Pro výrobu tichých bílých vín je optimální obsah cukernatosti 20 až 23°NM při současném dostatečném množství kyselin. Optimální množství celkových titrovatelných kyselin v moštech pro bílá vína je 6,5–9,0 g/l a pH 3,00–3,35. Negativními vlivy během dozrávání hroznů patří různé faktory jako mechanické poškození hroznů, napadení hnilobou, octěním, výskytem padlí. Negativní vlivy mohou urychlit zahájení sklizně [6].

Sklizeň hroznů v české republice probíhá od poloviny srpna u velmi raných odrůd (Irsai Oliver, Solaris) do začátku listopadu u pozdních odrůd (Ryzlink vlašský, Frankovka). Šetrný sběr včetně dopravy hroznů je základem pro výrobu kvalitního vína. Veškeré používané nádoby a zařízení musí být předem vymyté a musí být dodržována hygiena během celé sklizně. Vlastní sklizeň probíhá manuálně do různě velkých plastových beden o objemu od 10 do 700 l, nebo do větších návěsných kontejnerů. Při ručním sklizení dochází k minimálnímu poškození hroznů. Použitím mechanizovaných sklízečů hroznů dochází k úspoře času a pracovní síly. Během sklizně je nutné vyřazovat poškozené, nahnilé, nebo jinak nevyhovující hrozny [6-8].

1.2.1.2 Odstopkování a drcení bobulí

Po sklizni hroznů se v mlýnkoodzrňovači provádí odstopkování hroznů, při kterém se oddělí bobule od třapin. Bobule se dále pomačkají mezi válci a získá se hroznová drť, hroznový rmut. Mlýnkoodzrňovač se skládá ze dvou částí, odstopkovávací a drtící. Odstopkování probíhá

unášením hroznů šnekovým dopravníkem v bubnovém sítu, kde dochází k odtržení bobulí a jejich propadnutí. Moderní horizontální mlýnkoodzrňovače mají možnost volby průměru košů, otvorů v nich, vzdálenosti mezi válci a rychlosti otáček podle velikosti bobulí a stavu třapiny. Takto je možné šetrně oddělit bobule s minimem zlomků třapin a následně je optimálně podrtit. Třapiny jsou vynášeny ven jako odpad. Následuje pomačkání bobulí mezi drtícími válci. Zbytky třapin nebo listů mohou být zdrojem hořkých a svíravých látek [6, 9].

1.2.1.3 Naležení rmutu před lisováním

Předfermentační macerace hroznů před lisováním může měnit výsledný aroma profil bílých vín. Naležení rmutu je časovou prodlevou mezi odstopkováním a lisováním hroznů, při níž dochází k aktivaci přirozeně se vyskytujících hydrolytických enzymů v hroznech, které zvyšují tekutost rmutu a vylisnost hroznů. Během předfermentčních operací se uplatňují enzymy pektinázy, hemicelulázy, celulózy, glykozidázy, glukánázy. Délkou naležení (0–24 hodin) se omezuje nebo podporuje možnost uvolnění odrůdového aroma, zvýší se množství extraktivních složek, dusíkaté výživy pro kvasinky, nebo chuťově svíravé polyfenoly. Zvláštním druhem je studená macerace rmutu s chlazením na 5 °C s délkou trvání 2–19 dnů. Pro tento typ macerace jsou vhodné pouze zdravé vyzrálé hrozny v jednotné kvalitě a s omezením přístupu vzduchu např. v celouzavřených koších pneumatických lisů s nízkým přetlakem dusíku pro zamezení oxidace. Přidané hydrolytické enzymy zkracují dobu naležení rmutu a zvyšují vylisnost hroznů zejména v suchých ročnících, kdy je v hroznech vyšší obsah pektinů a méně přirozených hydrolytických enzymů. Při použití enzymových preparátů je nutná teplota alespoň 10 °C, jinak je aktivita enzymů malá. Při vyšších teplotách nad 20 °C může dojít k intenzivnímu rozbřednutí hroznů [6, 8].

1.2.1.4 Lisování

Účelem lisování je oddělení moštu od slupek bobule. Typy lisů mohou být od jednoduchých šroubových lisů s dřevěným košem, přes malokapacitní vertikální hydrolisy až po velkokapacitní horizontální lisy s mechanickým, hydraulickým nebo pneumatickým pohonem. Moderní lisy pracují podle různých programů podle stavu hroznů a dosahují vysokých lisovacích výkonů při zachování kvalitního produktu. Kvalitní mošt má po vylisování nízký obsah fenolických látek a nízký obsah kalů do 250 NTU (Nephelometric Turbidity Unit, zákalových jednotek) [6, 10].

Postup při lisování hroznů nebo bobulí může ovlivnit výslednou chuť a vůni vína. Lisovat se můžou celé hrozny nebo rmut. Lisováním celých hroznů se snižuje celková kapacita lisu,

ale s výhodou velmi nízkého obsahu kalů a nižšího uvolnění polyfenolů do moštu. Více využívané je lisování rmutu. Na začátku se z něj oddělí samotok, samovolně vytékající mošt, kterého může být až 60 % z celkového výtěžku. První moštové podíly obsahují nižší koncentrace polyfenolů a dusíkatých látek, mají nejvyšší obsahy cukrů, kyselin a kalových částic. S vyšším lisovacím tlakem se zvyšuje obsah tříslovin a snižuje se podíl kalů v moštu. Poslední podíly lisování jsou nejvíce čiré, ale ve víně se mohou projevit hrubosti v chuti a neharmonickým cizím aroma. Celkové množství vylisovaného moštu se pohybuje od 60 do 80 procent. Horizontální nebo mechanické lisy pracují při tlaku 0,2–0,5 MPa se 75 % výlisností. Pneumatické lisy dosahují stejné výlisnosti při tlacích mezi 0,02–0,20 MPa. Pneumatické lisy tedy za nižších tlaků dosahují vyšších výlisností při zachování vysoké kvality moštu a s nízkým obsahem kalů [6, 9, 11].

1.2.1.5 Přidávky oxidu siřičitého

Oxid siřičitý se ve vinařství používá pro zabránění množení nežádoucích mikroorganismů, jako octových a mléčných bakterií a nežádoucích kvasinek. Má tedy antimikrobiální a dále antioxidační účinky. Jeho další funkcí je zpomalení enzymatické oxidace a hnědnutí, které způsobují polyfenoloxidázy. Rozvoj nežádoucích mikroorganismů, a také enzymatická oxidace mohou měnit aromatické vlastnosti vína. V současné době se upouští od přidávání oxidu siřičitého k zdravým hroznům nebo rmutu. To je nutné pouze při použití poškozených hroznů (octění, hniloby). Do vylisovaného moštu je obvyklý přírůstek oxidu siřičitého je 20–50 mg na litr. U kyselých rmutů stačí dolní hranice dávky. Při nízkém obsahu kyselin v moštu je nutný přírůstek až k horní hranici. Pro snížení dávky oxidu siřičitého se používá kombinovaný přírůstek s kyselinou L-askorbovou. Funkcí kyseliny L-askorbové v přípravku je snížení oxidace moštu. Nepůsobí tedy proti nežádoucím mikroorganismům [6, 12].

1.2.1.6 Odkalování moštu

Pro výrobu bílých vín je dalším technologickým krokem odkalování moštu. Provádí se před fermentací s cílem snížení obsahu škodlivých mikroorganismů, reziduí pesticidů, minerálních nečistot a rostlinných částic ze slupek a dužniny. Tyto nežádoucí součásti moštu mohou negativně ovlivnit aromatickou a chuťovou čistotu vyráběného vína [6, 11].

Odkalování je možné provést sedimentací v nerezových nádobách, kdy se nečistoty nechají usazovat na dno nádrže. Při sedimentaci je lepší mošt podchládit na 10 °C pomocí aktivního chlazení, nebo umístěním nádrže v chladném sklepě. Čistý podíl nad kaly se odebírá během 10–24 hodin [6, 11].

Přidání čířících prostředků do moštu urychluje sedimentaci nežádoucích částic a zkracuje celkovou dobu odkalování. Jako čířící prostředek se používá bentonit, který také omezuje působení přirozeně přítomných enzymů. Množství přidaného bentonitu je asi 100 g na hektolitr. Další látkou pro odkalení může být přídavek želatiny. Ta významně snižuje obsah tříslovin, čímž zlepšuje sensorickou kvalitu moštu. Přídavek želatiny se pohybuje mezi 50–100 ml na hektolitr [6, 7].

Použitím strojového vybavení je možné provádět dynamické odkalení. Pro něj se používá vakuová filtrace, odstředivky nebo flotace, při které se moštem prohání vzduch nebo dusík v malých bublinkách, které vynášejí kalové částice na hladinu moštu. Ve spodní části nádrže se odebírá čistý podíl moštu. Dynamické odkalení může mít negativní vliv na výslednou sensorickou kvalitu vína nežádoucím odebráním aromatických látek [7].

Optimální odkalení moštu je na úroveň 200 NTU (zákalových jednotek). Při odkalení na nižší hodnotu NTU může nastat problém s nastartováním fermentace a jejím průběhem [6].

1.2.2 Alkoholová fermentace

Alkoholová fermentace je anaerobní biochemický proces, při kterém je vylisovaný mošt kvasinkami přeměněn na víno, nápoj s obsahem alkoholu. Kvasinky v postupných enzymatických reakcích přeměňují cukry glukózu a fruktózu na etanol a oxid uhličitý, který uniká do okolního prostředí. Schéma alkoholového kvašení popisuje rovnice 1.

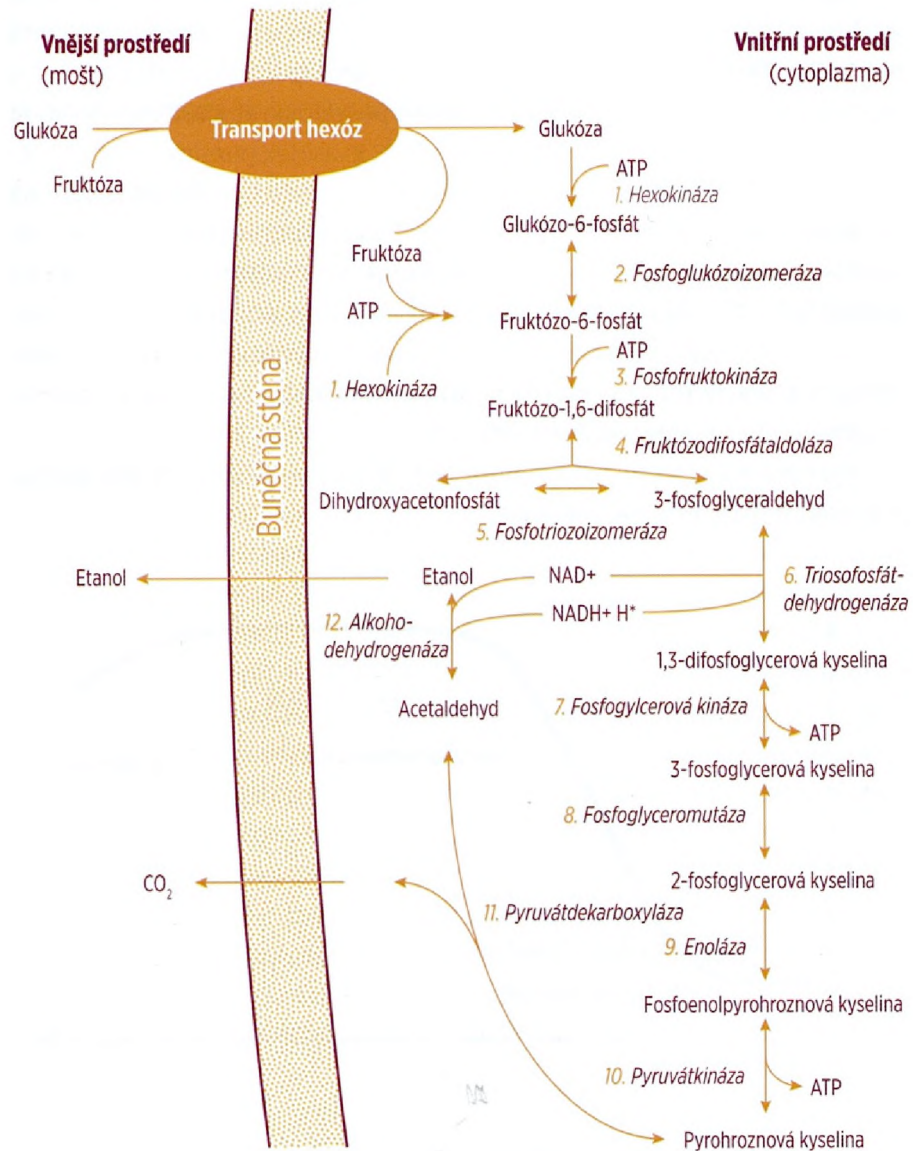


$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ představuje jednoduchý cukr glukózu nebo fruktózu. Teoreticky by mělo ze 100 g glukózy vzniknout 51,11 g etanolu a 48,89 g oxidu uhličitého. Praktický výtěžek etanolu se pohybuje okolo 47–48 g se vznikem dalších produktů fermentace. Kromě etanolu a CO_2 vznikají sensoricky aktivní látky, které mají vliv na budoucí chuť a vůni vína [6, 7].

1.2.2.1 Kvasinky

Kulturní kvasinky jsou nenahraditelným faktorem pro výrobu vína. Kvasinky jsou jednobuněčné mikroorganismy, přirozeně se vyskytují na hroznech, listech, v půdě vinice i v prostorech pro zpracování hroznů [13]. Z těchto zdrojů se dostávají do vylisovaných moštů, kde se mohou se dále rozmnožovat. V přírodním prostředí i v moštu se přirozeně nachází směs ušlechtilých a divokých kvasinek. Pro úspěšnou výrobu vína je nutná převaha kulturních kvasinek rodu *Saccharomyces cerevisiae*. Počet divokých kvasinek v moštu mnohonásobně převažuje nad kulturními kvasinkami. Mezi divoké kvasinky řadíme *apikulární Kloeckera*,

Candida, *Metschnikowia*, *Hansenula*, *Pichia*. Tyto divoké kvasinky vytvářejí produkty, které mohou mít pozitivní vliv např. vyšší obsah glycerolu, nebo negativní vliv tvorbou kyseliny octové [14]. Zabránit rozvoji divokých kvasinek lze malým přídavkem oxidu siřičitého. Jsou také citlivé na přítomnost etanolu a při koncentraci nad 4 % jejich činnost ustává [6, 7, 15].



Obrázek 1: Schéma dílčích chemických reakcí v kvasinkové buňce (převzato z [6])

Při samovolném kvašení ušlechtilé kvasinky postupně převažují nad divokými a mezi ušlechtilými kmeny se selektují odolnější k vyšší koncentraci etanolu. Proto se pro urychlení

procesu dominance kulturních kvasinek používá přidání čistých kultur kvasinek k moštu. Schéma průběhu dílčích chemických reakcí v kvasinkové buňce je na obrázku č. 1 [6].

Kulturní kvasinky mají dále schopnost prokvasit mošt s vysokým obsahem cukrů 23 °NM (23 kg/hl) až do nízkého obsahu zbytkového cukru 4 g/l. Dále se různé kvasinky se liší v schopnosti produkovat senzoričky aktivní látky, např. těkavé organické kyseliny, těkavé fenoly, sirovodík, vyšší alkoholy, glycerol, estery, vonné tioly, terpeny [6, 13].

Kulturní kvasinka vhodná pro výrobu vína je např. kmen *Saccharomces cerevisiae* var. *bayanus* LE05. Tato čistá kultura se získá izolací a rozmnožením jediné buňky. Jednotlivé druhy selektovaných kvasinek se mezi sebou liší v technologických vlastnostech, jako např. kvasinka snášející vyšší obsah cukrů v moštu, jiný psychrofilní kmen dokáže prokvašet rmut od 10 °C, alkohol tolerantní kmen snáší vyšší koncentrace etanolu než 10 %. Dále se používají kvasinky s vysokou aktivitou enzymu beta-lyázy, které jsou schopné na počátku alkoholového kvašení z původně netěkavých aminokyselinových prekurzorů hroznů uvolnit vonné tioly, které ve vínech podporují projevy angreštu, zimostrázu, výhonků černého rybízu nebo tropického ovoce [6, 15].

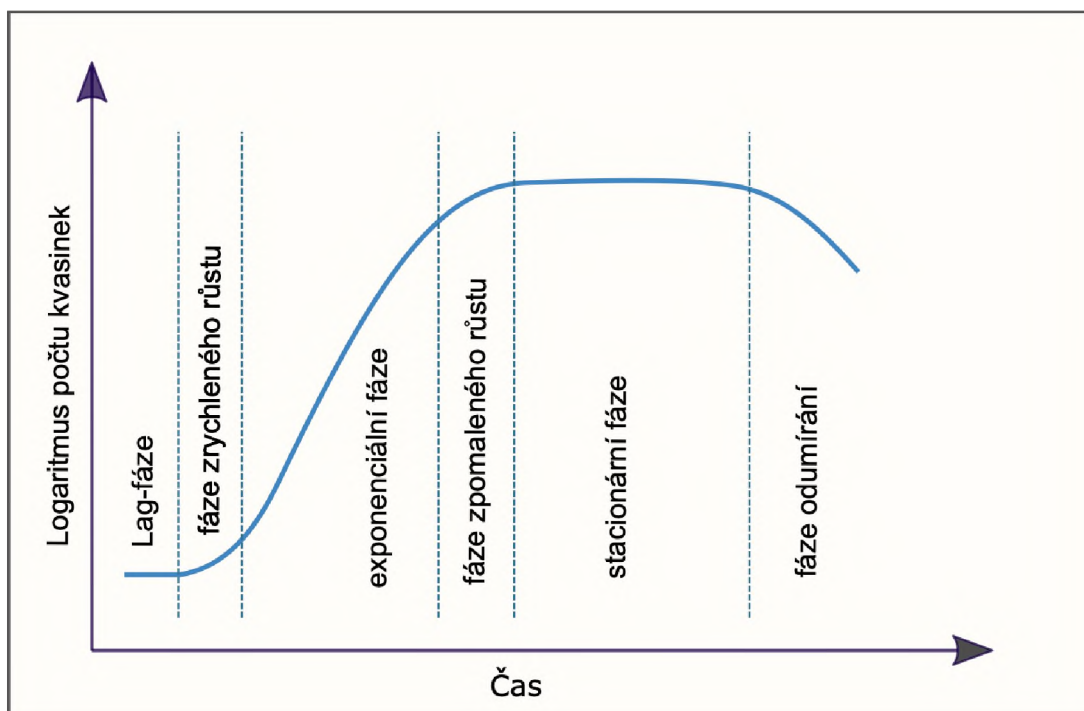
Ve vinařské technologii se experimentuje i s použitím nesaccharomycetními druhy kvasinek, které svými biochemickými schopnostmi dokážou vytvářet jiné složení vína a tím i jiný aromatický profil. Například kmeny kvasinky *Torulaspóra delbrueckii* vytvářejí méně těkavých kyselin během prokvašení moštů s vysokým obsahem cukrů (ledové, slámové a botrytické výběry) a kmeny kvasinek *Metschnikowia pulcherrima* mají vysokou enzymatickou glykozidázovou aktivitu s vyšším uvolňováním odrůdového aroma ze slupek hroznů [6, 16].

1.2.2.2 Průběh růstu kvasinek během kvašení moštu

Kvašení moštu probíhá v několika fázích, které kopírují jednotlivé fáze růstu kvasinek. Průběh fází závisí na druhu kvasinek a podmínkách kvašení.

Mezi podmínky ovlivňující kvašení patří obsah cukrů v moštu, přítomnost asimilovatelného dusíku, teplota, pH prostředí, množství kyslíku, tlak v kvasné nádobě, mechanické vlivy, hodnota zákalu moštu. Jednotlivé fáze množení kvasinek popisuje růstová křivka, viz. obrázek č. 2. Začátek křivky se nazývá lag-fáze. Při ní dochází k adaptaci kvasinek na prostředí a nedochází k jejich rozmnožování. Při této fázi může dojít k rozmnožení nežádoucích kvasinek, a proto je dobré vytvořit takové podmínky, aby se kvašení zahájilo do 24 hodin. Tomuto počátečnímu rozvoji množení kvasinek napomáhá provzdušnění moštu a jeho vyšší

teplota. Dále následuje fáze zrychleného růstu, při kterém se spustí rozmnožování kvasinek. Křivka pokračuje exponenciální fází, kdy probíhá rychlé množení kvasinek, až se přes fázi zpomaleného růstu dostane do stacionární fáze. Stacionární fáze je hlavní část kvašení, při kterém odumírá stejné množství kvasinek, jako přibývá nových a rychlost fermentace se nemění. Počet kvasinek v jenom mililitru v této fázi je více než sto miliónů. Čím je tato fáze kratší, tím rychleji kvašení proběhlo, a tím je tato část křivky kratší. Příliš krátká stacionární fáze může znamenat problém při kvašení, které se předčasně zastavilo. Poslední je fáze



odumírání, kdy probíhá dokvašení a postupně se zastavuje kvasný proces [6, 11, 15].

Obrázek 2: Růstová křivka kvasinky [6]

1.2.2.3 Faktory ovlivňující alkoholové kvašení

Alkoholové kvašení moštu je komplex biologických, fyzikálních, chemických a biochemických procesů, jejichž správným průběhem se vyrobí kvalitní víno ze sklizených hroznů. Důležitými faktory kvašení jsou kondice kvasinek, množství přítomného kyslíku, množství kyselin a související hodnota pH a obsah asimilovatelného dusíku. Při množení kvasinek je nutná přítomnost kyslíku. Vhodné je provzdušnění během prvotní fáze kvašení (6–8 mg/l), kdy je prokvašeno jen 10–30 % objemu cukrů. V této fázi nevzniká nebezpečí oxidace jednotlivých složek vína. V počáteční fázi rozmnožování ušlechtilé kvasinky využívají kyslík pro syntézu sterolů a nenasycených mastných kyselin, které jsou důležité pro stavbu buněčných membrán

transportujících cukry do buňky. Provzdušňování v pozdějších fázích kvašení je zbytečné a může způsobit ztrátu aroma výsledného vína [6, 7].

Optimální množství kyselin v moštu pro kvašení je 6,5–9,0 g/l. Hodnoty kyselosti moštu v tomto rozmezí pomáhají spolu s oxidem siřičitým udržet mikrobiální stálost moštu a čistšímu průběhu alkoholového kvašení. V České republice je legislativně zakázáno navyšovat obsah kyselin v moštu. Minimální doporučené hodnoty obsahu kyselin lze dosáhnout pouze sledováním množství kyselin v hroznech a podle průběhu jejich dozrávání zahájit, nebo pozdržet sklizeň. V některých ročnících s obecně nízkým množstvím kyselin v hroznech může nastat legislativní výjimka a dokyselování moštu je povoleno. Dokyselování se provádí v povoleném množství pomocí kyseliny vinné, jablečné nebo mléčné. V ročnících 2009, 2011, 2012 a 2015 bylo povoleno zvýšení obsahu kyselin o 2,5 g/l za přesně stanovených podmínek. Pokud koncentrace kyselin v moštu přesáhne 11 g/l, je možné uvažovat o chemickém odkyselení o 1–2 g/l, které pomáhá procesu jablečno-mléčné fermentace v mladém červeném víně. Legislativní předpisy povolují jakékoliv snížení kyselosti. Pro snížení kyselosti se používá přídavek uhličitanu vápenatého, jehož reakcí s kyselinami v moštu vznikne krystalický vinan vápenatý a oxid uhličitý se uvolňuje jako plyn. Přídavek 0,67 g uhličitanu vápenatého reaguje s 1 g kyseliny vinné [6, 7].

Zdravé a nepoškozené hrozny mají většinou dostatek všech vyživovacích látek pro růst a rozmnožování kvasinek během fermentace. U zdravých hroznů není nutné přidávat výživové látky jako asimilovatelný dusík, minerální látky, vitamíny. Pro přezrálé, poškozené nebo hrozny napadené botrytidou je vhodné kvasinky podpořit přídavkem živných solí. V živné soli mohou obsahovat hydrogenfosforečnan diamonný, síran amonný, thiamin, kyselinu pantothenovou. Dusíkaté látky jsou nutné pro rozmnožování kvasinek, stavbu jejich buněk, a pro tvorbu enzymů alkoholového kvašení. Při jejich nedostatku může docházet k pomalejšímu rozmnožování kvasinek nebo k úplnému zastavení kvašení před spotřebováním všech cukrů z moštu. Problémy s nedostatkem asimilovatelného dusíku jsou častěji u bílých vín vyrobených z hroznů suchého ročníku. Jako optimální množství asimilovatelného dusíku v moštu se uvádí hodnota v rozmezí 150–250 mg/l. Množství přídavku dusíkatých látek a vitamínů je legislativně omezeno na maximálně 100 g/hl síranu amonného nebo hydrogendifosforečnanu diamonného nebo jejich kombinace a přídavek 0,06 g/hl thiaminu hydrochloridu (vitamín B1) [6, 11].

1.2.2.4 Kontrola průběhu kvašení

Pro optimální průběh kvašení je nutné proces kontrolovat a v případě nežádoucího vývoje provést opravné opatření. V průběhu kvašení se sledují fyzikální, chemické a biochemické parametry jako snižující se cukernatost, koncentrace vznikajícího alkoholu, procento živých buněk kvasinek, tvorba oxidu uhličitého, teplota v kvasných nádobách. Teplota při kvašení je významný fyzikální faktor, kterým můžeme řídit délku a intenzitu kvasného procesu, ale také sensorický charakter budoucího vína. Pro čistý aromatický profil bílých, rosé i červených vín je důležité rozběhnout kvasný proces nejlépe do 24 hodin po vylisování hroznů. Brzké nastartování kvasného procesu lze podpořit ohřátím moštu na 20 °C. Pro ohřívání se používají různé elektrické ohřivače od nerezových ponorných, infračervených až po moderní kvasné dvouplášťové nádoby nebo nádoby s ponorným deskovým výměníkem, s možností chlazení nebo ohřívání kvasu. Počáteční teplota moštu před zahájením kvašení má velký vliv na dobu potřebnou pro nastartování kvašení. Při teplotě moštu 10–14 °C dochází k zahájení kvašení až po 5–6 dnech, při teplotě 17–18 °C se doba urychlí na 1–2 dny a při 20 °C se kvašení rozběhne za 12–24 hodin. V průběhu vlastního kvašení dochází k produkci tepla, proto je nutné monitorovat a řídit teplotu kvasu. Je doporučeno nepřesáhnout teplotu kvasu 25 °C pro bílá vína a 32 °C pro červená vína. V případě zvyšující se teploty se musí použít aktivní chlazení, přičemž snižování teploty musí být maximálně o 4 °C za hodinu pro zamezení teplotního šoku kvasinek s důsledkem možného zastavení kvasného procesu. Volba teploty, při které se bude udržovat kvašení, má při výrobě bílých a rosé vín vliv na typ a charakter budoucího vína. Při použití nižší teploty se podpoří čistý a aromatický projev a vyšší zisk alkoholu díky nižšímu výparu během fermentace. Zůstane také zachován vyšší obsah vznikajících aromatických látek vlivem méně bouřlivého unikání oxidu uhličitého. Pro dokvášení je vhodné udržovat teplotu na 20 °C. Během dokvášení dochází k vyšší aktivitě enzymů s glykozidázovou aktivitou, které uvolňují aroma z některých prekurzorů vína vázaných na sacharidy. Udržováním vyšší teploty na konci kvašení můžeme zvýšit jejich aktivitu a přispět k intenzivnějšímu aromatu. Potřeba zahřívání a chlazení během výroby vína je uvedena v tabulce č. 1. Účinek teploty na odrůdové aroma není doposud objasněný. Projev vůně je silně ovlivněn i produkcí těkavých tiolů (merkaptanů), které se uvolňují činností vybraných kmenů kvasinek. Některé tyto sirné sloučeniny jsou příčinou aromatických defektů vína, přičemž jiné přispívají pozitivně k aromatické pestrosti vín připomínající černý rybíz nebo grapefruit. Ovlivnění charakteru vína v závislosti na teplotě kvašení shrnuje tabulka č.2 [6, 7, 11].

Tabulka 1: Potřeba zahřívání a chlazení během vinifikace

Technologické stadium	Teplota
Studená macerace rmutu	Ochlazení na 5 °C
Nastartování kvašení	Ohřev na 20 °C
Kvašení	Chlazení na 10–29 °C podle stylu vín
Dokvážení	Ohřev na 20 °C
Nastartování jablečno-mléčné fermentace u červených vín	Ohřev na 19–22 °C
Čiření vín	Ohřev nad 15 °C

Průměrná doba řízeného alkoholového kvašení u moštů a rmutů s cukernatostí od 19 °NM do 23 °NM je deset dnů. Na konci kvašení by vína měla obsahovat do 4 g/l zbytkového cukru. Doba kvašení pod 7 dnů je příliš krátká z důvodů nízké cukernatosti nebo příliš vysoké teploty kvašení. Délka kvašení nad 14 dní je považována za příliš dlouhá s více možnými příčinami. Prodloužení kvašení může způsobit přílišné odkalení moštu, příliš nízká teplota kvašení, vysoký obsah oxidu siřičitého nebo vysoký obsah cukru [6].

Tabulka 2: Základní charakter vín v závislosti na teplotě kvašení

Druh vína	Teplota kvašení	Podporované vlastnosti
Bílá vína	12–15 °C	Pomalé kvašení, intenzivní tvorba kvasných esterů
	17–21 °C	Podpora odrůdového charakteru a odpovídající plnosti, vyšší uvolňování terpenů a vonných tiolů
	22–25 °C	Více glycerolu, vyšších alkoholů, fermentačních kyselin, předpoklad širšího aromatického a chuťového profilu
Červená vína	Do 24 °C	Podpora ovocnosti a odrůdovosti s jednodušším chuťovým projevem
	26–30 °C	Předpoklad tělnatějšího vína se složitější strukturou vůně a chuti

1.2.3 Školení vína

Školením vína nazýváme soubor operací a technologických postupů, kterými sklep mistr finalizuje víno a tím ho připraví pro lahvování. Pro školení vína není jednotný technologický postup, vždy záleží na zkušenostech sklepmistra, načasování jednotlivých kroků, na druhu vyráběného vína, na upravení postupů podle aktuálně zpracovávané šarže vína a zda se vyrábí konvenční vína nebo biovína. Některé kroky jako stáčení, filtrace nebo čiření mohou mít přímý vliv na aroma profil vína [8].

1.2.3.1 Stáčení vína

Stáčení vína patří mezi základní školící operace, při kterém se odděluje víno od usazených kalů. Podle rozsahu kontaktu stáčeného vína se vzduchem se také ovlivňuje jeho oxidačně redukční stav. Stáčení vína je možné provést několika postupy. Může se použít techniky otevřeného stáčení, uzavřené stáčení, nebo stáčení s rozstříkem vína. Každý druh stáčení je vhodný pro různý aktuální stav vína. Někdy je žádoucí vysoké provzdušnění a naopak [10].

1.2.3.2 Přídavek oxidu siřičitého

Přídavek oxidu siřičitého se už po staletí používá pro ochranění a ošetření vína při výrobě vína reduktivním způsobem. Ihned po přidavku začne oxid siřičitý reagovat s okolními látkami ve vínu, jako karbonylové sloučeniny, oxokyseliny zbytkové cukry. Část oxidu siřičitého reagujícího s jinými sloučeninami nazýváme jako vázaný, nespotřebovaný se nazývá volný. Součet volného a vázaného oxidu siřičitého se nazývá celkový oxid siřičitý. Volný oxid siřičitý se ve víně postupně spotřebovává a pro zachování antioxidačního účinku se musí při poklesu ve známých dávkách doplňovat. Z legislativního hlediska je oxid siřičitý označován za alergen. Výrobci biovín a naturálních vín se snaží požívání oxidu siřičitého co nejvíce omezit nebo zcela vynechat jeho přídavek k vínům [6, 12].

1.2.3.3 Čiření vína

Čiření vína se používá k odstranění zákalových částic, které by mohly způsobovat zákaly nebo sedimenty. Zákal se měří nefelometrem a hodnota zákalu se vyjadřuje v jednotkách NTU (Nephelometric Turbidity Unit). 1 NTU se rovná zákalu 2,3 mg oxidu křemičitého v 1 l vody. Pro jiskrně čistá vína mají tyto hodnoty zakalení v NTU méně než 1,1 pro bílá vína, méně než 1,2 pro růžová vína a méně než 2,0 pro červená vína [7].

Čiření vína je možné provádět několika různými způsoby. Nejčastěji se používá bentonit, želatina nebo křemičitý sol. Bentonity jsou bobtnatelné jíly složené z oxidů hliníku a křemíku. Na svůj povrch vážou bílkoviny, škodlivé biogenní aminy, enzymy a část mikroorganismů, barviv a chuťových a vonných látek. Želatina je rozpustná bílkovina původem z živočišné výroby. Obvykle se používá v kombinaci s křemičtým solem. Křemičitý sol je suspenze obsahující oxidy křemíku se zásaditou reakcí. Většinou se do vína nejprve přidá křemičitý sol a po několika hodinách vodná suspenze želatiny, aby převaha záporného náboje vína vytvořila okamžitý srážecí povrch pro kladně nabitou želatinu [6, 9].

1.2.3.4 Filtrace

Filtrace vína se používá pro oddělení pevných částic suspenze od kapalné části průtokem přes filtrační materiál. V závislosti na výrobním stavu vína a na důvodech pro filtraci lze zvolit některý typ filtrace, nejčastěji křemelinovou nebo celulózové vložky. Krmě pozitivních vlastností filtrace jako jiskrnost vína a mikrobiologická stálost se můžou projevit negativní vlivy jako ochuzení aroma vína. Do dvacátého století nebylo nutné vína příliš filtrovat. Prodej vína probíhal ze sudu přímo ze sklepa a vína byla prokvašena do sucha, nehrozilo tedy spuštění sekundární fermentace. Nedocházelo k vysrážení termolabilních bílkovin, protože dřívější vína

byla více polyfenolická, a proto se čistila lépe sama a byla tak stabilnější [6]. K tomuto postupu výroby se v současné době přibližují výrobci naturálních vín, kteří často používají jen hrubou filtraci a kalové částice jsou běžně přítomné v lahvi [6, 11].

1.2.4 Zrání vína

Během zrání vína dochází k ovlivňování jeho vlastností vlivem kyslíku. Během celé výroby může být bílým vínem absorbováno až 80 mg/l kyslíku a červeným vínem až 800 mg/l. Hlavními sloučeninami odpovědnými za vázání kyslíku jsou polyfenoly. Červená vína jich obsahují desetkrát více. Kyslík se do vína dostává během výroby (filtrace, stáčení, lahvování), nebo přes korkovou zátku. Kyslík se ve víně nejvíce spotřebovává oxidem siřičitým, polyfenoly, etanolem a acetaldehydem [6, 11].

1.2.4.1 Zrání vína na kvasničných kalech

Některá vína se nechávají po prokvašení zrát na kalech, procesem zvaným batonáž, po dobu nejméně 6 měsíců. Výsledkem jsou plná vína, s dlouhou dochutí a komplexním aroma. Výhodou této metody je možnost použití nižších dávek oxidu siřičitého ve srovnání s víny, která na kalech nezrají. Vína určená pro zrání na kalech musejí pocházet jen ze zdravých hroznů a s omezeným použitím přídatných látek [6].

1.3 Výroba červených vín konvenční metodou

Základní odlišnost mezi výrobou červených a bílých vín spočívá v tom, že se lisování provádí až po ukončení procesu macerace, tzn. po vyluhování červených barviv ze slupek bobulí hroznů. Předfermentační procesy zpracování hroznů, způsob zákvasu a regulace alkoholového kvašení jsou shodné s výrobou bílých vín. Rozlišují se tři základní postupy výroby červených vín. Výroba vína se současně probíhající alkoholovou fermentací a macerací rmutu, nebo výroba vína zahříváním hroznů, při které je oddělený proces macerace od kvašení a posledním postupem je výroba červených vín karbonickou macerací. Další z technologických odlišností výroby červeného vína je bakteriální nebo biologické odbourávání kyselin, nebo jablečno-mléčné kvašení či malolaktická fermentace. V tomto technologickém procesu dochází k změně sensoricky výrazné kyseliny jablečné na kyselinu chuťově jemnější kyselinu mléčnou. Rozhodnutí o využití bakteriálního odbourávání kyselin má významný vliv na sensorický charakter vyráběného vína [6, 7, 17].

1.4 Výroba naturálních vín

Výroba naturálních, přírodních, biovín a biodynamických vín probíhá různými technologickými kroky ve vinohradě i ve sklepě, které se více či méně odlišují od konvenční

výroby vína. Šíře pojatým společným cílem výroby těchto vín je udržitelná produkce hroznů na vinohradě s respektem k okolnímu ekosystému a s omezeným používáním postřiků, následným šetrným zpracováním hroznů a výrobě vína s omezeným nebo zcela eliminovaným použitím aditivních látek, včetně omezování siřičitanů. Po přírodních vínech postupně vzrůstá poptávka nejen od koncových spotřebitelů, ale pro své specifické senzorycké vlastnosti nalézají uplatnění i v oblasti luxusní gastronomie. Uvedené skupiny nekonvenčních vín lze rozdělit mezi taková, která jsou produkována podle legislativních požadavků nebo splňují požadavky některé certifikační autority (bio vína, biodynamická vína) a vína, která jsou vyráběna zcela mimo jakákoliv nařízení a producenti je deklarují jako zemská vína (naturální, autentická) [6, 18].

Trh s přírodními bio víny zažívá celosvětově vzrůstající trend. Vzhledem k nejednoznačné klasifikaci se v nabídce ve světě objevují vína s označením bio, biodynamická, naturální, bez přídavku oxidu siřičitého, vína s malým dopadem na životní prostředí, veganská nebo vegetariánská. Z hlediska spotřebitele je sjednocujícím prvkem těchto vín benefit zdravého vína bez přídavných látek a preparátů ze zemědělské produkce šetrné k životnímu prostředí [19].

1.4.1 Biovína a biodynamická vína

Biovína jsou vyráběna z certifikovaných hroznů, vypěstovaných podle zásad ekologických procesů a postupů v zemědělství, podle zákona č. 242/2000 Sb., nařízením Rady (EHS) č. 2092/92 a prováděcím nařízením Evropské komise 203/2012. Jedním z požadavků na biovína jsou nižší limity pro celkový obsah oxidu siřičitého ve víně, viz. tabulka č. 3. Dalšími výrobními postupy, které jsou zakázány, patří částečné zahuštění chladem, odsiřování, použití kyseliny sorbové. Biovína jsou označována logem ekologického zemědělství [6, 18].

Vína označovaná jako biodynamická musejí mít nejen kvalitu biovína, ale je nutné splňovat také další přísnější požadavky na hospodaření ve vinici, jako nepoužívání anorganických hnojiv a pesticidů [18]. Réva se ošetřuje pouze přípravky na přírodní bázi, různými výluhy z bylin, které si vinař sám sbírá a připravuje výluhy. Součástí biodynamické produkce je i celková filozofie péče o vinici s respektováním přírodních vlivů jako fáze měsíce a planet a jinými spirituálními a esoterickými podněty. V roce 1927 byla založena společnost Demeter, která v současnosti funguje jako celosvětově největší certifikační organizace pro biodynamické zemědělství [6, 19].

Tabulka 3: Limity obsahu celkového oxidu siřičitého v jednotlivých typech biovín dle prováděcího nařízení č. 203/2012

Typ biovína	Limit obsahu SO ₂ (mg/l)
Červené biovíno (do 2 g/l zbyt. cukru)	100
Bílé a rosé biovíno (do 2 g/l zbyt. cukru)	150
Bílé a rosé biovíno (od 2 g/l zbyt. cukru)	170
Bílé a rosé biovíno (od 2 g/l zbyt. cukru)	220
Pozdní sběr	270
Výběr z hroznů	320
Výběr z bobulí, výběr z cibéb, ledové a slámové biovíno	370
Šumivé víno jakostní	155

1.4.2 Naturální a autentická vína

Naturální vína patří do skupiny vín, které spojuje přírodní, autentický proces výroby a tradičního vinohradnictví, jehož postupy byly používány po staletí před nástupem průmyslové produkce vína s intenzivním zemědělstvím a využíváním chemických přípravků a selektovaných kvasinek. Pro naturální vína neexistuje žádná legislativní klasifikace ani požadavky na kvalitu, ani nějaký druh úřední certifikace. Někteří vinaři, produkující naturální vína, se pro jasnou identifikaci na trhu sdružují pod marketingově zvoleným názvem, jako např. Autentisté a dodržují svá vnitřní pravidla zapsaná v Chartě Autentistů. Ve svých zásadách pro pěstování révy požadují upřednostňovat ekologické zemědělství se zákazem veškerých herbicidů, syntetických insekticidů a systémových fungicidů a syntetických hnojiv. Dále se stanovuje maximální počet 5000 jedinců révy na hektar při nové výsadbě a maximální výnos 50 hl na hektar. Vylučují jiný než ruční sběr. Ve sklepě se vylučuje použití geneticky modifikovaných organismů, upřednostňují biologické, fyzikální a mechanické postupy před chemickými s vyloučením flotace. Ve sklepě nepoužívají selektované kvasinky, a proto mošty kvasí spontánně pomocí autochtonních kvasinek přítomných na hroznech a ve sklepě. Vontrobova E. a kol.[13] popisují druhy autochtonních kvasinek přítomných na hroznech a změnu jejich zastoupení během fermentace vína. Nesmí se přidávat taniny do červených i bílých vín, preferuje se fermentace v dřevěných, keramických nebo skleněných nádobách.

Nesmí se používat ostrá filtrace vín a veškerý obsah oxidu siřičitého nesmí překročit 100 mg/l v bílých vínech a 80 mg/l v červených vínech. Jako naturální víno je možné označit víno z ekologické produkce s respektováním místního terroir, bez používání chemických postřiků a přidaných aditiv a s minimálním nebo žádným přídavkem oxidu siřičitého[19].

1.4.3 Oranžová vína

Mezi naturální vína lze zařadit i oranžová vína. Tyto vína se vyrábí z bílých hroznů s použitím odlišné technologie. Při výrobě těchto vín dochází k delšímu kontaktu slupek s moštem na rozdíl od běžné konvenční výroby bílých vín, kdy se slupky oddělí ihned po lisování. Při delší maceraci se ze slupek uvolní více látek a dosáhne se sytější barvy moštu. Během následné fermentace s částečným přístupem kyslíku se barva vína mění na oranžový odstín. Oranžová vína se často vyrábějí v tradičních keramických nádobách nazývaných kvevri původem z Gruzie, viz. obrázek č.3. Základem technologie je dlouhodobý kontakt vína s pevnými částmi bobulí a kalů po dobu několika měsíců. Zdravé bobule jsou umístěné do kvevri, kde dochází k dlouhé maceraci, spontánní fermentaci s následně dlouhodobé ležení s minimálním množstvím zásahů. Barva takového vína je tmavší až oranžová. Objem kvevri je nejběžněji 200–2000 litrů a je obvykle až po hrdlo zakopána v zemi. Takto vyrobená vína mají vyšší obsah polyfenolů, zejména flavonoidů. Jejich koncentrace je kolem 2000 mg/l, což odpovídá světlým červeným vínům. Díky vysokému obsahu flavonoidů je prováděno redukované nebo zcela vynechané síření vína před lahvování. Termín oranžová vína použil poprvé David Harvey, britský znalec vín, v roce 2004 [20, 21].



Obrázek 3. Kvevri - tradiční gruzínská nádoba z pálené hlíny na výrobu vína. Foto © www.qvevriwein.at

1.5 Chemické složení vína

Víno je složitá směs těkavých a netěkavých látek rozpuštěných ve vodě, jejichž přítomnost a vzájemné poměry tvoří chuť a aroma vína. Ve vínu je přítomných několik stovek různých sloučenin [22]. Jejich koncentrace závisí na jejich složení v hroznech a je ovlivněno následným alkoholovým kvašením. Těkavé látky se ve víně vyskytují v koncentracích od ng/L až do mg/L. Jejich příspěvek na výsledné aroma je různý, závislý na prahu čichu pro jednotlivé sloučeniny a jejich koncentraci. Aroma vína je ovlivňováno čtyřmi faktory: genetikou révy, sklizní hroznů, alkoholovou fermentací a zráním vína [23]. Podle obsahu některých složek se hotová vína rozlišují do různých kategorií podle obsahu zbytkového cukru, nebo množství alkoholu. Největší podíl podle objemu vína má voda původem z hroznů v množství 70–90 %. Další sloučeninou je etanol v množství 7–15 %. U vín se zbytkovým cukrem je jeho obsah v rozmezí 0–100 g/l a podle něj se rozlišují vína do kategorií suché, polosuché, polosladké a sladké. Ledová a slámová vína mají obsah zbytkových cukrů ještě vyšší, až 300 g/l. U vína dále můžeme rozlišit obsah těkavých a netěkavých složek. Mezi těkavé složky, které jsou oddělitelné z vína varem, patří alkoholy, aldehydy a ketony, těkavé kyseliny, oxid siřičitý. Průměrný obsah těkavých látek ve víně je uveden v tabulce č. 4. Netěkavé látky ve víně tvoří extrakt, jež je ve víně v rozmezí 1–15 % [6, 9, 10].

Tabulka 4: Průměrný obsah těkavých látek ve víně

Těkavá složka	Obsah ve víně (g/l)
Alkohol	55–120
Vyšší alkoholy	0,2–9,8
Aldehydy a ketony	0,01–0,10
Jiné látky tvořící aroma	0,001–0,100
Těkavé kyseliny	0,1–2,1
Oxid siřičitý	0,01–0,40

1.5.1 Alkoholy

1.5.1.1 Etanol

Etanol je hlavní produkt alkoholového kvašení a má mezi alkoholy přítomnými ve vínu dominantní zastoupení. Vzniká alkoholovou fermentací kvasinkami z glukosy a fruktózy na etanol a oxid uhličitý. Výsledná hodnota koncentrace etanolu ve víně závisí na počáteční

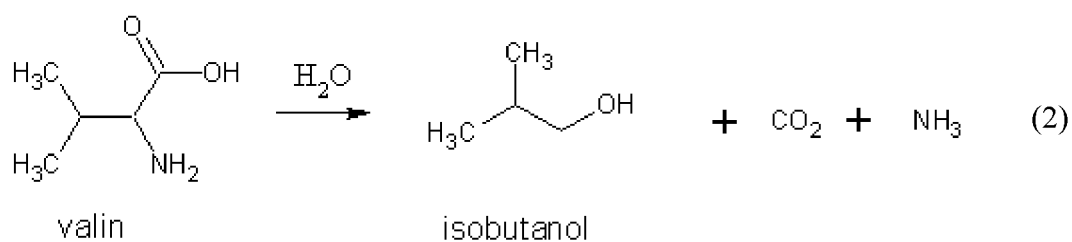
cukernatosti moštu. Ze 100 g glukózy teoreticky vznikne 51,11 g alkoholu. Průměrný obsah alkoholu ve víně se pohybuje mezi 7–15 %. Jeho výsledné množství závisí na kvalitě sklizených hroznů, jejich zralosti a obsahu cukrů. Výsledný obsah alkoholu lze ovlivnit i řízeným kvašením, kdy lze fermentaci zastavit dříve, pro vyšší obsah zbytkového cukru ve víně. Během zrání vína v dřevěných sudech může koncentrace vlivem odparu klesat ročně o 0,2 %. Ve víně také může docházet k prodýchávání etanolu křisovými kvasinkami, které vytvářejí podmínky pro oxidaci etanolu na acetaldehyd a dál na kyselinu octovou za působení bakterií octového kvašení. [10, 24].

1.5.1.2 Metanol

Přítomnost metanolu ve víně je spojena s hydrolyzou pektinů, která probíhá vlivem enzymů během alkoholové fermentace. Metanol není přímým produktem alkoholové fermentace. Jeho množství ve víně závisí na délce macerace pevných částí sklizených hroznů, zejména slupek. Celkový podíl metanolu v bílých vínech je 17–100 mg/l a v červených vínech v rozmezí 60–230 mg/l [10, 24].

1.5.1.3 Vyšší alkoholy

Vyšší nasycené alkoholy se ve víně nacházejí v malém množství 200–600 mg/l. Mají ale důležitý vliv na výsledné aroma vína. Mezi nejvýznamnější vyšší alkoholy patří izopropylalkohol, izobutylalkohol, 2-metylalkohol a 3-metylalkohol. Vyšší alkoholy se nevyskytují v bobulích, ale vznikají reakcemi doprovázejícími fermentaci, které jsou spojené s metabolismem kvasinek. Tvorbu vyšších alkoholů je možné vysvětlit Ehrlichovou reakcí, probíhající jako dekarboxylace a následná deaminace s přechodným meziproduktem ketokyselinou, viz. rovnice 2 [10, 24].



1.5.1.4 Terpenové alkoholy

Ve víně jsou přítomné čtyři terpenoly v dostatečném množství, aby se mohly podílet na aroma vína. Jsou to linalol, geraniol, nerol a α -terpineol. U muškátových vín se nacházejí v řádu miligramů na litr. Linalol je terpenoidní alkohol, který se vyskytuje v mnoha květinách a koření a tvoří aroma popisované jako vůně květů. Jeho koncentrace v révě Muškát alexandrijský je

v množství 0,2–0,8 mg/l, kdy čichový práh je řádově 0,1 mg/l, proto se podílí na aroma vína. Geraniol, Nerol a α -terpineol nejsou považovány za významné složky aroma vína, kvůli jejich nízkým koncentracím [10, 24].

1.5.1.5 Polyalkoholy

Polyalkoholy jsou vícesytné alkoholy s dvěma a více hydroxylovými funkčními skupinami. Jejich koncentrace ve víně je velmi různá, v závislosti na stupni vyzrání hroznů a vlivu klimatických podmínek ročníku [10, 24].

1.5.1.6 Dioly

Dioly jsou dvojsytné alkoholy, které obsahují dvě hydroxylové skupiny. Ve vínech je detekována přítomnost butan-2,3-diol a propan-1,3-diol. Butan-2,3-diol vzniká jako sekundární produkt alkoholové fermentace pocházející z redukce acetoinu vytvořeného kondenzací dvou molekul etanolu. Propan-1,3-diol se ve víně vyskytuje jen ve stopovém množství [10, 25].

1.5.1.7 Polyoly

Ve složení vína je významnou složkou glycerol. Jeho průměrný obsah je ve víně v rozmezí 5–25 g/l, proto je ve víně třetí složkou v pořadí podle koncentrace za vodou a etanolem. Ve své struktuře obsahuje tři hydroxylové skupiny, které jsou odpovědné za jeho rozpustnost a hygroskopickou povahu se sladkou chutí a nízkou toxicitou. Sladkou chuť vínu dodává jen velmi málo, ale přispívá k jemnosti vína. Práh vnímání je od 5,2 g/l a ideální poměr glycerolu k alkoholu ve víně je 7 %. Glycerol vzniká v počátcích alkoholového kvašení a je produkován divokými kvasinkami. Jeho tvorba závisí na počátečním množství cukrů, charakteru kvasinek a podmínkách fermentace. Tvorba glycerolu se zvyšuje při nižším zasíření [10, 25].

Erytrol je polyol se čtyřmi hydroxylovými skupinami, který se přirozeně vyskytuje v některých druzích ovoce a fermentovaných výrobcích. Má sladkou chuť a nízkou kalorickou hodnotu. Koncentrace ve vínech je v rozmezí 10–200 mg/l. Je nejspíše druhotným produktem kvasinek [10].

Mezi pentoly, polyalkoholy s pěti hydroxylovými skupinami patří arabitol, xylitol, ribitol. Arabitol a xylitol se ve víně vyskytuje v koncentracích 15–50 mg/l, ribitol jen ve stopovém množství. Zvýšená koncentrace pentolů v mošttech závisí na výskytu plísně šedé a ušlechtilé plísně [10, 24].

Hexoly přítomné ve víně jsou mannitol a sorbitol. Přítomnost mannitolu ve víně nad 100 mg/l není normální a svědčí o přítomnosti bakterií mléčného kvašení a zastavení normálního průběhu

kvašení kvasinkami. Sorbitol je isomerem mannitolu a je přítomný ve větším množství v různých druzích ovoce jako jsou jablka, hrušky, broskve a švestky. V malém množství je přítomný i v hroznech a ve víně by neměl přesáhnout 100 mg/l. Je-li zjištěné množství vyšší, je pravděpodobné, že víno vzniklo ze směsi hroznů a jiného ovoce, čili jde o podvodnou kupáž vína s jiným typem moštu, nejčastěji jablečným [10, 24].

1.5.2 Sacharidy

Sacharidy jsou organické molekuly patřící do skupiny polyhydroxyderivátů karbonylových sloučenin. Obsahují buď aldehydickou nebo ketonickou skupinu. Podle počtu uhlíků ve struktuře je dělíme na triózy, tetózy, pentózy a hexózy, přičemž pro víno jsou důležité pentózy a hexózy. Podle počtu jednotek ve struktuře je možné je rozdělit na monosacharidy, neboli jednoduché cukry, disacharidy, které jsou složeny z 2–10 monosacharidů, a polysacharidy, které jsou složeny z více než 10 monosacharidů [9, 10, 26].

1.5.2.1 Monosacharidy pentózy

Monosacharidy pentózy ($C_5H_{10}O_5$) jsou ve víně přítomné ve významném množství 0,5–1,0 g/l. Kulturní kvasinky rodu *Saccharomyces* pentózy nezksašují, proto nejsou při alkoholovém kvašení využívány a zůstávají ve víně a ovlivňují jeho chuť. Ve vínech mohou být přítomné pentózy L-arabinóza, D-ribóza, D-xylóza a L-rhamnóza [10, 26].

1.5.2.2 Monosacharidy hexózy

Hexózy ($C_6H_{12}O_6$) jsou pro víno nejdůležitější monosacharidy. Hexózy jsou metabolizovány kvasinkami rodu *Saccharomyces* za vzniku etanolu a oxidu uhličitého. Mezi důležité hexózy přítomné ve vínu patří D-glukóza, D-fruktóza a D-galaktóza. Poměr glukózy a fruktózy v hroznovém moštu bývá stabilní v poměru glukóza:fruktóza 0,95:1,00. Kvasinky při fermentaci přednostně metabolizují D-glukózu, proto její obsah klesá rychleji než fruktózy nebo galaktózy a při prokvašení vína do sucha bývá podíl zbytkové fruktózy vyšší než glukózy [10, 26].

1.5.2.3 Oligosacharidy

Oligosacharidy jsou tvořeny dvěma až deseti monosacharidovými jednotkami. Z oligosacharidů jsou důležité disacharidy, které jsou složeny ze dvou monosacharidů spojených glykosidickou vazbou. Disacharidy se ve vínech nacházejí jen ve stopovém množství. V moštu je v malém množství 2–5 g/l přítomný disacharid sacharóza, složeny z D-glukózy a D-fruktózy. Během alkoholového kvašení se sacharóza hydrolyzuje na D-glukózu

a D-fruktózu, a tyto monosacharidy jsou metabolizovány kvasinkami. V hotovém vínu by sacharóza neměla být přítomná [10, 26].

1.5.2.4 Polysacharidy

Polysacharidy jsou řetězce více než deseti monosacharidů. Mohou být lineární, větvené nebo heterogenní. Ve víně je 2–4 g/l polysacharidů. Tvoří podstatnou část koloidních sloučenin, a proto jsou nežádoucí pro potíže při filtraci. Mezi polysacharidy se řadí slizy, gumy a pektiny. Čistý pektin je vytvářen lineárním řetězcem metanolem esterifikovaných polygalakturonových jader. Pravý pektin se nachází v mladých vínech po skončení fermentace v koncentracích až 500 mg/l. Po roce ležení vína obsah pektinu rychle hydrolyzou klesá, se vznikem galakturonových kyselin, metanolu, arabinózy, galaktózy, ramnózy a xylózy. Dalším zdrojem polysacharidů ve víně mohou být kvasinky. Ty mají ve svých buněčných stěnách velké množství mannoproteinů, které jsou tvořeny asi ze 70 % D-mannózou, z 10–20 % bílkovinami a 10 % glukózou. Tyto polyglykosidy jsou vylučovány kvasinkou během alkoholové fermentace s koncentrací ve víně 100–150 mg/l. Mannoproteiny mají technologický význam, neboť pravděpodobně inhibují bílkovinné zákaly a vypadávání vinného kamene, a proto mají význam pro stabilitu vín [10, 26].

1.5.3 Dusíkaté sloučeniny

Dusíkaté sloučeniny se ve víně vyskytují v nevelkém množství 0,5–5,0 g/l ve všech formách. Z tohoto obsahu je 5–10 % bílkoviny, které se postupně ztrácejí, 25–50 % tvoří polypeptidy, 25–30 % volné aminokyseliny, 3–10 % amoniakální dusík a zbytek jsou aminy a amidy. Volné aminokyseliny jsou prekurzory aromatických látek a mají význam při vzniku buketu. Během kvašení dochází k asimilaci různých dusíkatých látek kvasinkami (amoniak a jednodušší aminokyseliny) a současně se dusíkaté látky vylučují, zejména aminokyseliny. Naproti tomu peptidy pocházejí hlavně z třapin a semen, proto čím více je mošt v kontaktu s těmito částmi hroznů, tím více obsahuje peptidových látek [10, 24].

1.5.3.1 Amoniakální dusík

Amoniakální dusík je kvasinkami využíván jako živina. V moštu je přítomné 20–240 mg/l amoniakálního dusíku a v průběhu fermentace se jeho množství rychle snižuje až pod 10 mg/l v bílých vínech [10].

1.5.3.2 Aminokyseliny

Ve víně se vyskytují všechny známé aminokyseliny. Hlavními jsou prolin, arginin a glutamin, které spolu tvoří 80 % všech aminokyselin. Největší podíl z nich zaujímá prolin. Ten kvasinky

neasimilují bez přítomnosti kyslíku. Poměr jednotlivých aminokyselin se během fermentace mění. V prvních 16–24 hodinách dochází k prudkému poklesu. Následuje stabilizace a dále se může obsah některých aminokyselin prudce zvýšit. Příkladem může být již zmiňovaný prolin, který je obtížně asimilovatelný kvasinkami a jehož koncentrace se může ve víně zvýšit i nad obsah zaznamenaný v moštu. U argininu probíhá proces opačně [9, 10, 24].

1.5.3.3 Peptidy

Obsah peptidů ve víně až 4 g/l závisí na celkových faktorech přítomnosti dusíkatých látek jako odrůdy, vinifikace. Původ polypeptidů je vysvětlován polymerizací aminokyselin, nebo rozkladem bílkovin. V bílém víně je dvakrát méně polypeptidů než v červeném. Přítomnost peptidů může způsobovat hořkost vína. Jako příklad tripeptidu je glutation. Tvoří ho kyselina glutamová, jeden cystein a glycin. Glutation je běžně přítomný v moštu v různém množství v závislosti na odrůdě (až 100 µg/l) [10, 24].

1.5.4 Vitaminy

Ve víně jsou přítomné vitaminy rozpustné ve vodě, tj. vitaminy C a skupiny B. V hroznech a moštu se nachází asi 50 mg/l vitamínu C, kyseliny askorbové. Během alkoholové fermentace se ztrácí a v hotovém víně je obsaženo 1–10 mg/l. Vitamin C ve víně zabraňuje vzniku železitého zákalu a brání oxidaci aromatických látek a tím udržuje jeho sensorické vlastnosti. Je povolený přídavek kyseliny askorbové do vína, ale ten se rychle spotřebovává v oxidačně-redukčních reakcích. Ze zdravotního hlediska je obsah vitamínů ve víně nepodstatný [6, 10].

1.5.5 Minerální látky

Kořeny révy přijímají s vodou i minerální látky, které jsou potřebné pro růst rostliny. Ty se dále přenášejí do hroznů a tím i do moštu. Jejich množství a složení závisí na půdě, klimatických podmínkách, hnojení a vyzrállosti hroznů. Průměrný obsah minerálních látek ve víně je 1,3–4,0 g/l a vyjadřují se jako obsah popela, který vznikne po vysušení a spálení vína. Největší podíl na prvkovém složení vína má draslík, dále vápník, hořčík a další prvky. Minerální prvky ovlivňují chuť vína [6, 9].

1.5.6 Kyseliny

Ve víně je obsaženo mnoho různých organických kyselin. Celkové množství kyselin se skládá z těkavých a netěkavých kyselin. Celkový obsah kyselin v moštu závisí na klimatických podmínkách jako délka slunečního svitu, průměrná teplota a vlhkost, charakteru odrůdy révy vinné. Na charakter a podíl kyselin ve víně mají vliv i další faktory jako různý metabolismus různých kvasinkových kmenů během fermentace.

1.5.6.1 Těkavé kyseliny

Těkavé kyseliny jsou tvořeny nižšími mastnými kyselinami, zejména kyselinou octovou. Kyselina octová může v malé míře vznikat i během alkoholové fermentace. Její vyšší koncentrace však vznikají oxidací etanolu za přístupu vzduchu octovými bakteriemi na nahnilých hroznech a během výroby nebo skladování vína znehodnocují jeho kvalitu. Obsah těkavých kyselin ve víně je legislativně omezen a nesmí přesahovat u bílých vín 1,35 g/l, u červených vín 1,50 g/l, v přepočtu na kyselinu vinnou. Obsah kyseliny octové se ve víně pohybuje v rozmezí 0,3–0,6 g/l, přičemž kyselina octová tvoří až 95 % těkavých kyselin [6, 10, 27].

1.5.6.2 Netěkavé kyseliny

Kyselost vín tvoří nejvíce kyselina vinná (0,5–5,0 g/l) a kyselina jablečná (0–9,0 g/l), které pochází přímo z hroznů. Dále je přítomné malé množství kyseliny citronové (0,05 – 0,5 g/l). Během kvasného procesu se v moštu a víně vyskytují další netěkavé kyseliny jako mléčná (0,05–6 g/l), jantarová (0,2–1,5 g/l), pyrohroznová (0,01–0,1 g/l) a další. Množství kyseliny mléčné kvasinky neovlivňují. Časem její obsah klesá z důvodu vysrážení vínanu draselného, nazývaného vinný kámen. Kyselina jablečná může být nejčastější ve víně z nevyzrálých hroznů. Kyselina jablečná je zkvasitelná, mohou jí rozkládat některé druhy kvasinek *Saccharomyces* a všechna druhy *Schizosaccharomyces*. Toto kvašení se označuje jako jablečno-alkoholové. Kyselinu jablečnou mohou dekarboxylovat také bakterie mléčného kvašení (Jablečno-mléčné kvašení). Tento proces se využívá při výrobě červených vín na přeměnu kyseliny jablečné na mléčnou, čímž se víno zjemní [6, 9, 10].

Netěkavé kyseliny jsou hlavní součástí celkových kyselin titrovatelných louhem do neutrální reakce. Běžný obsah titrovatelných kyselin se ve vínech pohybuje mezi 4–9 g/l. Bílá vína obecně obsahují více kyselin než červená vína. Podle právních předpisů je minimální obsah celkových titrovatelných kyselin ve víně vyjádřených jako kyselina vinná stanoven na 3,5 g/l [6, 24].

1.5.7 Fenolové sloučeniny

Fenolové sloučeniny, které obsahují jedno nebo více fenolových jader ovlivňují barvu vína, působí na organoleptické vlastnosti vína a podílejí se na procesech uchování a ležení vín. Kromě barvy ovlivňují hořkost, svíravý pocit v chuti, zadržování kyslíku a průběh stárnutí vína. Jejich obsah je u šetrně zpracovaných bílých vín do 0,25 g/l, u červených vín až do 4,5 g/l.

Fenolové sloučeniny je možné rozdělit do čtyřech skupin na fenolové kyseliny, třísloviny (taniny), flavony a flavonoly, antokyany [10, 28, 29].

Tabulka 5: Hodnoty fenolových sloučenin ve víně

Sloučenina	Bílá vína (mg/l)	Červená vína (mg/l)
Fenolové kyseliny	1–10	100–200
Třísloviny	1–100	1000–5000
Flavony a flavonoly	stopy	do 15
Antokyany	stopy	200–500

1.5.7.1 Fenolové kyseliny a jejich deriváty

Fenolové kyseliny se dělí do dvou skupin na hydroxylové deriváty kyseliny benzoové a deriváty kyseliny skořicové. Některé fenolové kyseliny a hydroxylové deriváty kyseliny skořicové mohou být prekurzory některých těkavých fenolů, např. kyselina p-kumarová a kyselina ferulová. Fenolové kyseliny jsou z hlediska aroma neutrální, ale po transformaci na těkavé fenoly obohacují aroma vína příjemnými projevy. Vinylfenol má vůni hvozdíku či karafiátu s prahem vnímání 0,8 mg/l, vinylguajakol vůni hřebíčku s prahem 0,6 mg/l, etylfenol má živočišný pach koňského potu s prahem 0,6 mg/l a etylguajakol má pach spáleného dřeva s prahem vnímání 0,1 mg/l. Přítomnost kyseliny chlorogenové (ester kyseliny kávové) se podílí na buketu starých vín svojí pronikavou a intenzivní vůní [9, 10, 28].

1.5.7.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou sloučeniny, které obsahují jako základní strukturu fenylobenzopyran, neboli flavan. Další dvě možné struktury flavonoidů jsou chalkony a aurony. Tyto struktury jsou mezi sebou v rovnováze zejména podle hodnoty pH. Flavonoidy jsou často vázány s jednou nebo více molekulami glukózy do sloučenin zvaných glykosidy. Přítomnost glukózových jednotek zajišťuje větší rozpustnost flavonoidů ve vodně-alkoholovém prostředí, jakým je víno. Flavonoidy způsobují ve vínu hořkost [10, 28].

1.5.7.3 Antokyany

Antokyany jsou červené pigmenty hroznů přítomné ve slupce bobule hroznů, ale vyskytují se i v jiném ovoci nebo listech rostlin. V mladých červených vínech je přítomno 200–500 mg/l

antokyanů, ale jen stopové množství v bílých vínech. Termín antokyaniny se používá pro označení antokyanidinů (centrální struktura bez navázaných cukerných jednotek) a antokyaninů, které označují sloučeniny antokyanidinů s různým počtem cukerných jednotek. Mezi antokyanidiny přítomné ve víně patří kyanidin, peonidin, delphinidin, malvidin, petunidin. Z těchto pěti antokyanidinů bylo identifikováno v jednotlivých odrůdách až sedmnáct různých červených pigmentů, antokyaninů. V hotových červených vínech se antokyaniny slučují s tříslovinami, a tím mají stabilnější barvu z mírné ztráty antokyanů. Ztráty volných antokyanů během prvních tří měsíců mohou dosáhnout 10–50 %. Tak červené víno každoročně ztrácí množství volných antokyanů, až se hodnota ustálí na 10–20 mg/l [10, 28].

1.5.7.4 Třísloviny

Třísloviny hroznů a vína tvoří různorodou skupinu sloučenin, vzniklých převážně kondenzací katechinů. Katechiny jsou monomery flavonoly, vyskytující se v hroznech ve strukturách (+) katechinů a (-) epikatechinů. Jsou to prekurzory tříslovin, které vzniknou jejich kondenzací. V mladých vínech bývají spojené dvě až tři jednotky flavanolů. Ve starých vínech jsou v důsledku následných kondenzací přítomné řetězce tříslovin až desítek jednotek. Třísloviny jsou obsaženy v semenech hroznů. Třísloviny přinášejí z organoleptického hlediska stavbu vína, jeho tělo a strukturu. Z negativních projevů svíravost a hořkost. Výsledný dojem závisí na kvalitě a kvantitě tříslovin. Slučování tříslovin s polysacharidy způsobuje zjemňování tříslovin [10, 28].

1.5.7.5 Polyfenoly vína a jejich vliv na zdraví

Intenzivní výzkum polyfenolů ve víně probíhá pro zjištění jejich vlivů na lidský organizmus. Fenolové sloučeniny působí antioxidantně proti volným radikálům, a proto jsou zkoumány z hlediska terapeutického využití. Kromě pozitivního působení polyfenolových sloučenin při prevenci kardiovaskulárních chorob a zlepšení krevního oběhu mají tyto sloučeniny pozitivní vliv na zpomalení mozkového stárnutí a prevenci Alzheimerovy nemoci. Fenolové sloučeniny mají dále protizánětlivé, protirakovinné vlastnosti a působí na zlepšení účinnosti látek snižujících cholesterol v krvi. Polyfenoly extrahované z hroznových semen jsou součástí léčiv, jako složka kosmetických a léčivých krémů, zatímco polyfenoly extrahované z hroznových slupek jsou užívány k přípravě nápojů pro sportovce. Další polyfenol z vína, trans-resveratrol, vykazuje protirakovinné vlastnosti. Trans-resveratrol je protifungická látka, kterou réva vylučuje jako ochranu proti některým mikroorganismům a houbám vyvolávajícím hnilobu. Tento difenol se koncentruje ve slupce bobule hroznů, ale může být i semenech. V červených vínech je v rozmezí 1–10 mg/l [10].

1.5.8 Estery

V hroznovém moštu nejsou estery téměř přítomné. Ve víně se vznikající alkohol za přítomnosti kyselin esterifikuje na těkavé etylestery, které se podílejí na tvorbě aroma vína. Estery ve víně vznikají dvojím způsobem. První je chemický esterifikačními reakcemi a druhý biologický, který vzniká činností kvasinek nebo bakterií. Na začátku ležení vína mají větší zastoupení estery biologického původu nad estery chemickými. Časem se však poměr obrátí, neboť podíl biologických esterů hydrolýzou klesá a vznikají z nich alkoholy a kyseliny, které se mohou transformovat chemickou cestou na estery. Celkově je problematika tvorby esterů ve víně velice komplexní proces s obtížně kvantifikovatelným ověřením složení [9, 10].

1.5.8.1 Biologická esterifikace

Biologická esterifikace je navázána na činnost kvasinek během alkoholové fermentace, při které vzniká velmi malé množství esterů biologického původu v množství několik miligramů na litr vína. Různorodost vzniklých esterů je navázána na různé kmeny kvasinek. Dalšími vlivy na druhy vznikajících esterů jsou podmínky fermentace, teplotou, sířením, dusíkatým složením hroznů a charakteristikou a stupněm zralosti odrůdy. Zástupcem biologické esterifikace je etylacetát. Je produkován kvasinkami i bakteriemi. Může se vyskytovat v poměrně velkém množství mezi 100–150 mg/l, což je hranice čichového prahu. Nakyslost se projevuje zápachem po laku nebo rozpouštědlu. Další příklad biologické esterifikace je mléčnan etylnatý, etyllaktát, který vzniká během jablečno-mléčného kvašení v množství 40–60 mg/l. Vína, ve kterých neproběhlo jablečno-mléčné kvašení, obsahují pouze 5–10 mg/l etyllaktátu. Etyllaktát má vůni másla až kyselého mléka a zjemňuje aroma vína. Dalšími zástupci jsou etylestery mastných kyselin. Etylhexanoát (etylkapronát) má čichový práh vnímání 0,5 mg/l a tvoří jablečnou nebo banánovou vůni. Etyloktanoát (etylkaprylát) má čichový práh 1 mg/l a jeho vůně připomíná hruškové nebo ananasové aroma. Etyldekanoát má čichový práh 0,2 mg/l. Ačkoliv jsou tyto estery ve víně přítomné na hranici čichového prahu, mohou ovlivňovat celkový aroma profil vína a dodávat mu ovocné nebo medové tóny [10].

1.5.8.2 Chemická esterifikace

Ve víně s 10 % alkoholu se vyskytuje maximálně 12 % volných kyselin schopných esterifikace. Monokyseliny jsou reaktivnější než polykyseliny a dosahují rovnováhu esterifikace v jednom roce nebo v několika letech a vytvářejí neutrální estery. Polykyseliny za stejných podmínek vytvářejí neutrální rovnováhu až po několika desítkách let a tvoří neutrální, kyselé a smíšené estery [10].

1.6 Extrakce těkavých látek

Z průměrného složení vína je zřejmé, že etanol a další těkavé látky tvoří jen menší část obsahu. Většinu tvoří voda a netěkavé složky. Technika plynové chromatografie je určena pro analýzy těkavých látek. Netěkavé látky by měření na GC rušily, nebo dokonce znemožnily, kvůli zanesení úzké kapiláry analytické kolony složkami matrice vzorku. Jako přípravu vzorku před měřením aromatických látek je nutné provést jejich izolaci od matrice některou z extrakčních technik. Nestarším a nejpoužívanějším způsobem extrakce je v systému kapalina-kapalina, jinak zvaná extrakce rozpouštědlem. Pro stanovení aromatických látek z vína má tento typ extrakce nevýhody, jako jsou spotřeba velkých objemů rozpouštědel a jejich následná likvidace, současná extrakce i netěkavých látek, časová náročnost. Proto je pro tento typ analýzy výhodnější použít jiné typy extrakce, které nepoužívají organická rozpouštědla. Mezi alternativní extrakční techniky řadíme extrakci na tuhou fázi, mikroextrakci na tuhou fázi, techniku odběru vzorku headspace a kombinaci technik mikroextrakce na tuhou fázi s headspace technikou. Existují i další metody jako extrakce nadkritickou tekutinou a sorpční extrakce na míchadle.

1.6.1 Extrakce kapalina-kapalina

Podstatou extrakce systémem kapalina-kapalina, LLE) je distribuce složek mezi dvě nemísitelné kapaliny, často vodný roztok vzorku a organické rozpouštědlo. Hydrofilní sloučeniny setrvávají ve vodné polární fázi, kdežto nepolární sloučeniny se přemisťují do hydrofobního nepolárního rozpouštědla. Pro zachování dostatečné účinnosti extrakce je nutné optimalizovat výběr rozpouštědla s preferencí jeho omezené rozpustnosti v matrici vzorku, dále kompatibilitu rozpouštědla s analytickou koncovkou, nízký bod varu rozpouštědla. Nejčastěji se používají organická rozpouštědla dichlormetan, diethyleter, pentan, hexan. Vlastní extrakce často probíhá v třepačkách, pro zajištění lepšího kontaktu obou kapalin.

Perestrelo R. a kol. [30] extrahoval metodou kapalina-kapalina těkavé látky z červeného vína odrůdy Tina Negra Mole z Madeiry dichlormetanem, s následným zakoncentrováním látek v proudu dusíku. Stanovením plynovým chromatografem bylo identifikováno 86 sloučenin s uspokojivým určením 80 sloučenin s koncentračním rozpětím od několika mikrogramů na litr po 259,1 mg/l.

1.6.2 Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází (Solid-Phase Extraction, SPE) je založena na použití kolony s naplněným ložem ze sorbentu, který se využívá pro zachycení analytů ze vzorku nebo také k jeho

přečištění. Existuje množství různých typů kolonek lišících se materiálem (polypropylen, plast) objemem kolonky, množstvím sorbentu v kolonce, maximálním množstvím zadrženého analytu. SPE kolonky mohou být využívány pro různé metody extrakce jako odstranění interferujících látek, zakoncentrování analytu, změna rozpouštědla vzorku nebo odsolení. Kolonky jsou umístěné ve speciálním držáku, který je připojený k vakuu, pomocí něhož dojde k přefiltrování vzorku přes lože kolonky. Selektivní extrakce zadrží analyty a ostatní složky matrice se nezachytí. Selektivní eluce je používána pro zadržení analytů i ostatních složek matrice s následnou elucí pouze cílených analytů. Selektivní promývání zachytí analyty i ostatní složky matrice, poté se vymyjí nežádoucí látky, a nakonec se vymyjí analyty. Další možností využití SPE je odstranění matrice, při kterém se zachytí nežádoucí složky vzorku a analyt prochází bez zádrže. Při SPE se používají fáze podle druhu vzorku. Polární fáze jsou silikagel, oxid hlinitý, nepolární fáze je modifikovaný silikagel (C8, C18), a iontoměničové anxy a katexy [31].

1.6.3 Mikroextrakce na tuhou fázi SPME

Mikroextrakce tuhou fází (Solid-Phase Microextraction, SPME) je technika přípravy vzorku představená v roce 1990 [32] jako alternativa k extrakci kapalina-kapalina nebo extrakci tuhou fází. Konstrukce SPME sestává z pouzdra s jehlou podobnému stříkačce pro GC, který má na konci pístu křemenné vlákno s povlakem sorbentu. SPME je technika, která izoluje a zakoncentruje těkavé analyty ze vzorku v jednom kroku. Vzorkovat je možné ponořením vlákna přímo do kapalného vzorku nebo metodou headspace z plynné fáze nad vzorkem. Podle matrice vzorku a stanovovaných analytů se zvolí sorbent vlákna vhodný pro polární nebo nepolární látky. Použitelnost extrakce metodou SPME závisí na výběru vhodné stacionární fáze vlákna. Při potřebě extrahovat široké spektrum látek od těkavých po polotěkavé, polární nebo nepolární, je nezbytné použít SPME vlákno s povlakem stacionární fáze, který bude extrahovat požadovanou skupinu látek [33]. Mezi nepolární sorbenty patří polydimethylsiloxanová vlákna (PDMS) s použitím pro extrakci nepolárních látek. Více polární je sorbent polyakrylát (PA) s využitím pro více polární látky jako fenoly nebo alkoholy. Dále je možné zvolit vlákna s kombinovanými sorbenty jako divinylbenzen (DVB) společně s PDMS, Carboxen (CAR) s DVB, Carbowax (CW) s DVB, které se používají pro extrakci těkavých látek s nízkou molekulovou hmotností a pro polární analyty [34]. Typy stacionárních fází a jejich extrakční mechanismus a polarita je uveden v tabulce č.6. Extrakční SPME vlákna je možné opakovaně používat až pro stovky extrakcí, v závislosti na typu vzorků [35].

Tabulka 6: Typy stacionárních fází SPME, extrakční mechanismus a polarita

Typ stacionární fáze SPME	Extrakční mechanismus	Polarita
7-mm PDMS	Absorbent	Nepolární
30-mm PDMS	Absorbent	Nepolární
100-mm PDMS	Absorbent	Nepolární
85-mm PA	Absorbent	Polární
60-mm PEG	Absorbent	Polární
15-mm carbopack Z-PDMS	Absorbent	Bipolární
65-mm PDMS-DVB	Adsorbent	Bipolární
55-mm/30-mm DVB/carboxen-PDMS	Adsorbent	Bipolární
85-mm carboxen-PDMS	Adsorbent	Bipolární

Principem SPME vzorkování je absorpce nebo adsorpce analytů vláknem s povlakem stacionární fáze do dosažení rovnovážného stavu. Když je dosaženo rovnovážného rozdělení mezi matricí a povlakem stacionární fáze vlákna, je extrakce považována za dokončenou. Rovnovážený stav je možné popsat rovnicí 3, kde n je množství extrahované povlakem stacionární fáze, K_{fs} je distribuční koeficient mezi vláknem a matricí vzorku, V_f je objem povlaku stacionární fáze, V_s je objem vzorku a C_o je počáteční koncentrace analytu ve vzorku [33].

$$n = \frac{K_{fs} \cdot V_f \cdot V_s \cdot C_o}{K_{fs} \cdot V_f + V_s} \quad (3)$$

SPME technika je vhodná pro vzorkování pevných, kapalných i plyných vzorků a nachází uplatnění v různých analýzách od environmentálních vzorků, analýzu těkavých látek v potravinách až po techniky biologické vzorkování a in vivo aplikace [36]. Postupným

rozvojem SPME se vyvíjejí další geometrie SPME techniky jako „coated-tip“ miniaturizované vlákno s délkou 150 μm s průměrem 10–30 μm ; modifikované vlákno ve tvaru šipky; sorbent umístěný na vnitřní stěnu duté jehly; sorbent ve tvaru tenkého filmu; tenký film na formátu 96 čepelí; uvnitř pipetovací špičky nebo na magnetických nanočásticích [36].

Technika extrakce HS-GCMS je široce využívána pro analýzu těkavých organických látek ve víně [22, 37-39]. Od roku 1997 je vzrůstající trend vědeckých článků používající techniku HS-GCMS pro analýzu aroma vína [33].

Studie Robinsona a kol. [40] ukázala, že matrice má vliv na rozdělovací koeficient, specifický pro danou sloučeninu a ovlivňuje složení těkavých látek v headspace prostoru. Tyto výsledky vedou k závěru, že pro použití techniky SPME pro analýzu vína je důležité co nejlépe optimalizovat podmínky pro extrakci, aby cílené analyty mohly být správně identifikovány a nenastávalo vzájemné ovlivňování složek. S jakoukoli složitou matricí jako je víno, nebo kde je široká řada analytů, jako jsou aromatické sloučeniny, by mělo být nalezeno kompromisní řešení pro volbu podmínek extrakce metodou SPME.

Správná optimalizace extrakčních podmínek zajišťuje přesnost a správnost měření, společně s nízkými detekčními limity. Při analýze aroma vína metodou SPME je obvykle vhodné optimalizovat dobu extrakce, teplotu při extrakci, vysolovací efekt, třepání a typ sorbentu na vlákne [41, 42].

Citlivost extrakce SPME vláknem se zvyšuje proporčně s tloušťkou stacionární fáze. Velmi tenký povlak je možné využít u aplikací, při kterých není důležitá citlivost metody a přínosem může být kratší extrakční čas [43].

1.6.4 Další možnosti extrakce

Mezi další možnosti extrakce patří sorpční extrakce na míchadle (Stir-Bar Sorptive Extraction, SBSE). Magnetické míchadlo je pokryté 0,5–1,0 mm silnou vrstvou polymerního filmu tvořeného polydimethylsiloxanem. PDMS vykazuje nízkou afinitu k alkoholu, proto je využíván k extrakci těkavých organických látek z alkoholových nápojů [44]. Vzorek se míchadlem extrahuje po dobu 30–240 minut [45]. Výhodou použití extra na míchadle je silnější vrstva PDMS filmu, která zvyšuje extrakční kapacitu, zvyšuje citlivost a snižuje detekční limity [45, 46].

1.7 Stanovení těkavých látek aroma vína metodou plynové chromatografie

1.7.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (Gas Chromatography, GC) je důležitou analytickou technikou pro identifikaci a kvantitativní stanovení chemických látek. První plynový chromatograf stávající konstrukce byl sestaven v laboratořích Britské lékařské rady v Londýně pracovníky A.T. Jamesem a A.J.P. Martinem již v roce 1952 [47]. Současná analýza moderním plynovým chromatografem je separační technika, pomocí které je možné stanovovat složité směsi těkavých látek z různých matric pevných, kapalných i plynných vzorků. Separace stanovovaných látek probíhá v kapilární koloně, jejich interakcemi s navázanou stacionární fází. Mobilní fází, která zajišťuje pohyb vzorku kolonu, je protékající plyn, nejčastěji helium, dusík nebo vodík.



Obrázek 4: Plynový chromatograf model 154-B výrobce PerkinElmer z roku 1956 [47].

Při unášení vzorku kapilární kolonou se opakovaně ustavuje rovnováha mezi stacionární a mobilní fází. Vlivem různé retence unášených látek k stacionární fázi, vždy specifické pro danou látku, dochází k jejich separaci. Podle typu analyzovaných sloučenin se volí kapilární kolona s vhodnou stacionární fází pro jejich separaci. Stacionární fáze rozlišujeme nepolární, polární a jejich různé modifikace navázanými funkčními skupinami. Podmínkou měření na plynovém chromatografu je dosažitelnost uvedení vzorku nebo extraktu vzorku do plynného stavu, nejčastěji pomocí zahřátí a vypaření alikvotní části vzorku v nástřikovém portu přístroje. Kapalným vzorkem je dávkován do nástřikového portu stříkačkou. Pomocí techniky plynové chromatografie je možné stanovovat několik stovek tisíc látek od koncentrací v řádu jednotek procent až po stopová množství. Technika plynové chromatografie je vhodná pro měření těkavých organických látek, včetně aroma profilů potravin a nápojů [34]. Metodu je možné využít pro stanovení aromatických látek tvořících sensorické vlastnosti vín.

1.7.1.1 Konstrukce plynového chromatografu

Konstrukce plynových chromatografů je již standardizovaná a sestává z několika součástí. Přístroj má přívod nosného plynu, vyhřívaný port pro nadávkování vzorku (injektor), prostor pro umístění analytické kolony s možností termostatování a detektor pro zaznamenání separovaných látek.

Jako nosný plyn se nejčastěji používá helium, dusík nebo vodík. Čistota nosného plynu musí být vysoká, aby nedocházelo k zvyšování pozadí měření nečistotami přítomnými v plynu. Tlaková lahev s plynem je pomocí regulačního ventilu spojena kapilárou se vstupem nosného plynu do plynového chromatografu, kde je dále průtok řízen regulačním prvkem.

Vyhřívaný port pro nadávkování vzorku je termostatovaný uzavřený prostor (injektor), kterým protéká nosný plyn do analytické kolony. S vnějším prostředím je injektor oddělen silikonovým těsněním (septum), přes které lze mikrostríkačkou nadávkovat alikvotní objem vzorku dovnitř injektoru, ve kterém dojde k jeho vypaření a transportu nosným plynem do analytické kolony. Standardně je injektor vyhříván na teplotu vyšší, než je nejvyšší bod varu každé složky vzorku, pro zabránění kondenzace vzorku v injektoru a jeho kontaminaci.

Analytická kolona, nyní nejčastěji kapilární, se nachází v termostatovaném prostoru, ve kterém lze řídit průběh teploty. Analýzy jednodušších vzorků lze provádět izotermicky, ale pro komplexní analýzu vzorků s několika desítkami látek je využíván teplotní program termostatu, pro ovlivnění separace eluovaných látek. Kapilární kolony se rozlišují podle navázané stacionární fáze a její tloušťky, délky a průměru. Kolona je vyrobená z křemenné kapiláry potažené vrstvou polyamidu pro její větší mechanickou odolnost. Délka kapiláry je obvykle mezi 5–100 metry, o vnitřním průměru 50–530 μm a tloušťce filmu stacionární fáze 0,1–3,0 μm . Stacionární fáze se liší podle polaritativy od nepolární dimethyl polysiloxanové po polární polyetylen glykolovou. Mezi nimi existují stacionární fáze s různými modifikacemi funkčními skupinami vhodné pro separaci specifických skupin sloučenin.

Konec kapilární kolony je těsně připojen do detektoru, který zaznamenává separované sloučeniny opouštějící kolonu. Detektory se dělí na univerzální a specifické, destruktivní a nedestruktivní. Speciálním druhem je hmotnostní detektor, který kromě zaznamenání odezvy jednotlivých sloučenin poskytuje i podrobnější informace o chemické struktuře látky v podobě zaznamenání hmotnostních spekter.

Identifikace sloučenin detekovaných plynovým chromatografem je založena na porovnání retenčního času stanovované látky s retenčním časem standardu látky. Jedná se tedy

o srovnávací metodu, při které je vždy nutné naměřený výsledek vztáhnout k změřeným výsledkům známého standardu. Protože detektory pro plynové chromatografy nejsou specifické, mohou mít dvě různé látky za daných podmínek měření stejný retenční čas (koeluce píků). Pro identifikaci neznámých látek, ke kterým laboratoř nemá standardy a k větší spolehlivosti konfirmace identity je využíván systém založený na zjištění retenčních indexů jednotlivých látek. Pro vytvoření indexu se s neznámými vzorky změří homologická řada nerozvětvených *n*-alkanů a každému uhlíku je přiřazena hodnota 100. Pro neizotermální průběh měření je používán Den Doolův a Kratzův retenční index, jehož výpočet se provádí podle rovnice 4.

$$RI = 100 \cdot \frac{t'_x - t'_z}{t'_{z+1} - t'_z} + 100 \cdot z \quad (4)$$

kde t'_x , t'_z , t'_{z+1} jsou redukované retenční časy látky, *n*-alkanů se *z* uhlíky a *n*-alkanů se *z*+1 uhlíky

1.7.1.2 Plamenový ionizační detektor

Plamenový ionizační detektor (FID) je univerzální destruktivní typ detektoru, který patří mezi nejpoužívanější. Jeho předností je jednoduchá konstrukce, univerzální citlivost k organickým sloučeninám a velký dynamický rozsah pře sedm řádů. V detektoru hoří vodíkový plamínek, do kterého je vnitřkem trysky zasunutý konec kapilární kolony, ze které vycházejí separované sloučeniny, které se v plamínku spálí za vzniku oblaku iontů. Na trysku je vložen potenciál a přes oblak nabitých iontů se přenesou proud na elektrodu kolektoru. Změřený proud je úměrný množství iontů. Kim H.M. a kol. [48] vyvinuli a zvalidovali jednoduchou metodu pro stanovení 11 těkavých organických látek v pivu, ovocných vínech, vínech a destilátech pomocí plynové chromatografie s plamenem ionizační detekcí.

1.7.1.3 Tepelně vodivostní detektor

Tepelně vodivostní detektor byl používán v plynovém chromatografu jako první. Jedná se o univerzální nedestruktivní detektor, který poskytuje odezvu nejen na organické sloučeniny, ale je použitelný i pro detekci plynů H₂, O₂, N₂, CO₂, uhlovodíků C₁–C₅ nebo H₂O. Princip detektoru je založen na dvouvláknovém Wheatstoneově můstku, jehož jedna část je umístěna v analytické cele s průtokem nosného plynu z kolony a druhá část je v referenční cele s čistým nosným plynem. Vlivem přítomnosti separované látky v proudu nosného plynu se změní

vodivost v Wheatstoneově můstku v analytické cele a je zaznamenána výchylka proti referenční cele.

1.7.1.4 Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometr je unikátní detektor pro plynovou chromatografii, protože poskytuje nejen kvantitativní informaci o detekované sloučenině, ale také informace o chemické struktuře, která je zaznamenána v podobě hmotnostního spektra. Podle hmotnostního spektra je možné zpětnou rekonstrukcí ze zaznamenaných fragmentů jednotlivých hmot identifikovat původní sloučeninu, a pro potvrzení ho porovnat se spektrem změřeného standardu látky, nebo ho pro konfirmaci identity porovnat s komerční knihovnou spekter.

Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, analyzátoru iontů a detektoru. Celý detektor je ve vysokém vakuu (10^{-3} až 10^{-11} Pa), které vytváří turbomolekulární pumpa podporovaná rotační vakuovou pumpou. V iontovém zdroji vznikají z neutrálních molekul nabitě ionty. Pro spojení plynového chromatografu s hmotnostním detektorem (GC-MS) se nejčastěji používá tvrdá ionizační technika (elektronová ionizace), při které jsou molekuly analytů vstupujících do iontového zdroje vystaveny proudu elektronů z wolframového nebo rheniového vlákna, nebo rheniového vlákna s povlakem oxidu yttritího. Molekuly při interakci s elektrony získají přebytek vnitřní energie, který vede k rozpadu molekuly na molekulární fragmenty. Při použití ionizační energie 70 eV je získané hmotnostní spektrum opakovatelné a porovnatelné mezi různými GCMS analýzami, proto je možné využívání rozsáhlých databází naměřených spekter látek, např. NIST Mass Spectral Library – National Institute of Standards and Technology, nebo Wiley Registry of Mass Spectral Data. Vzniklé ionty jsou fokusovány do kvadrupólového analyzátoru pomocí extrakčních čoček. V kvadrupólovém analyzátoru dochází k průletu nabitých iontů mezi tyčemi kvadrupólu a jejich třídění podle poměru hmotnosti k náboji. Na kvadrupól je vloženo vysokofrekvenční střídavé a zároveň stejnosměrné napětí, pomocí kterého se reguluje cílený průlet iontů do detektoru elektronového násobiče, který registruje kvantitativní zastoupení detekovaných iontů.

1.7.2 Headspace vzorkování

Headspace (HS) je technika vzorkování, při které se pro měření využívá plynné fáze s obsahem těkavých látek uvolněných ze vzorku. Vzorek v kapalném nebo tuhém skupenství se umístí do uzavřené nádoby a temperuje se při konstantní teplotě do ustavení rovnováhy mezi koncentrací látky v tuhém nebo kapalném vzorku a plynném prostoru nad vzorkem. Z plynného prostoru se poté odebere alikvotní část, která se přenesení do nástřikového portu

plynového chromatografu, kde probíhá chromatografická separace a detekce sloučenin. Headspace je ideální technika pro použití s plynovým chromatografem, protože obě techniky spojuje určení pro analýzu těkavých, nebo středně těkavých látek [49]. Velkou výhodou headspace je minimální nebo žádná příprava vzorku před analýzou. Vzorek většinou stačí pouze odvážit nebo odměřit do nádobky bez dalších úprav a zahájit temperaci, při které se uvolní těkavé sloučeniny ze vzorku. Dalším efektem je eliminace matrice vzorku, která dále spolu s netěkavými látkami neovlivňuje následnou analýzu. Pro posunutí rovnováhy více do plynné části je možné využít efekt vysolování. Přidáním NaCl ke kapalnému vzorku v nádobce se sníží rozpustnost analytů v matrici, a tím se zvýší koncentrace v plynné fázi. Tento efekt neprobíhá stejně pro všechny sloučeniny [49]. Pro většinu analytů platí, že s rostoucím množstvím soli přidané k matrici se zvyšuje citlivost metody [50]. Pro analýzu aroma profilu vína v této práci byl přídavek NaCl pro efekt vysolení ke vzorku používán.

1.7.2.1 Dynamický headspace

Dynamický headspace je proces kontinuální extrakce a separace těkavých látek inertním plynem nebo probubláváním vzorku metodou v zařízení „purge and trap“. Uvolněné těkavé látky jsou unášeny inertním plynem do sorpčního lože (cold trap), kde se zachytí. Při následném rychlém zahřátí sorbentu se těkavé látky najednou uvolní a společně jsou přeneseny do plynového chromatografu. Používá se hydrofobní adsorbent typu tenax, carbopack, carbotrap, a jiné [49].

1.7.2.2 Statický headspace

Pro techniku vzorkování statickým headspace se vzorek (kapalina nebo pevná látka) uzavře do plynotěsné nádobky s ponecháním prostoru pro plyn nad vzorkem. Nádobka se temperuje za konstantní teploty pro dosažení rovnovážného stavu mezi dvěma fázemi. Po ustavení rovnováhy se odebere alikvotní část plynné fáze pro analýzu v plynovém chromatografu. Alikvotní část vzorku může být přenesena manuálně, např. pomocí plynotěsné stříkačky, nebo automatizovaným autosamplerem na principu plynotěsné stříkačky, nebo natlakováním vialky inertním plynem a přesunem alikvotní části na kolonu, nebo pomocí SPME [51].

1.7.2.2.1 Statický headspace s plynotěsnou stříkačkou

Odběr alikvotní části vzorku plynotěsnou stříkačkou je možný provést manuálně, nebo pomocí automatizovaného zařízení. Manuální přenos alikvoty má nevýhodu v nekontrolované teplotě stříkačky a tím riziku kondenzace analytů. Manuální i automatizovaný transport má dále nevýhodu ve změně vzorku v důsledku expanze přes jehlu stříkačky na atmosférický tlak [49].

1.7.2.2.2 Statický headspace metodou mikroextrakce na tuhou fázi (HS-SPME)

Princip funkce mikroextrakce na tuhou fázi je popsán v kapitole 6.3. Při vzorkování pomocí SPME je vzorek uzavřen v plynotěsné nádobce víčkem se silikonovým středem (septum). Sorpční vlákno je uchycené v pouzdře modifikované stříkačky pro GC a připevněno na píst. Jehla pouzdry se zasune přes septum do termostatované nádoby a vysune se sorpční vlákno. Při vzorkování technikou headspace je vlákno umístěno v plynném prostoru nádoby nad vzorkem a nechá se exponovat těkavými látkami do ustavení rovnováhy. V případě SPME vzorkování vzniká třífázový systém mezi matricí vzorku, plynnou fází nad vzorkem a sorbentem na vláknech. Nastávají tedy dva rovnovážné systémy, a to mezi vzorkem a plynnou fází a mezi plynnou fází a sorbentem vlákna. Po uplynutí potřebné doby se vlákno zasune zpět do jehly, pouzdro s vláknem se vytáhne z nádoby a přemístí se do horkého nástřikového portu plynového chromatografu, kde se nasorbované látky z vlákna uvolní a jsou mobilní fází unášeny do analytické kolony [51, 52].

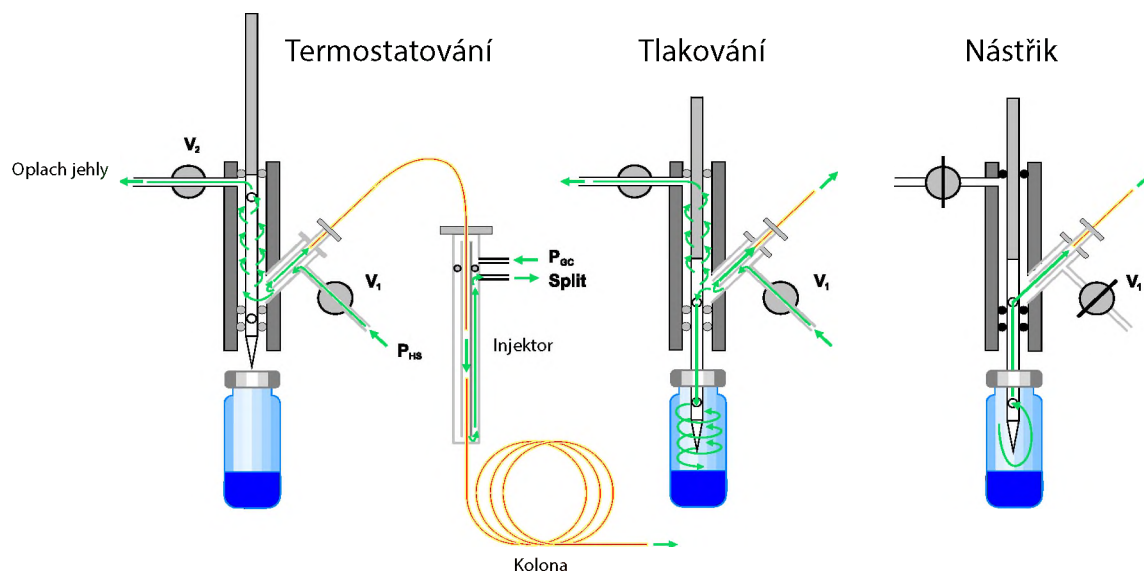
Kolb B. a Ettre L.S. [49] porovnávali citlivost techniky statického headspace s SPME headspace. Přestože porovnání je obtížné z různých důvodů jako diskriminace vůči některým sloučeninám, těkavosti látek, jejich polaritě a rozpustnosti, provedli výpočet absolutního přeneseného množství látky do GC pro obě techniky. S teoretickým modelem 2 ml vodného roztoku 5 mg/mL benzenu v 10 mililitrové vialce pro HS-SPME s použitím vlákna s tloušťkou filmu 30 μm spočítali absorpci 23,7 ng benzenu a pro statický headspace s odebraným objemem 50 μl spočítali nadávkové množství benzenu 30 ng.

Bajer T. a kol. [53] optimalizovali metodu HS-SPME s analytickou koncovkou GC a GCMS pro zjištění rozdílů mezi aroma profily ovocných destilátů původem z různých druhů ovoce. Statistickou analýzou naměřených dat identifikovali signifikantní sloučeniny pro určení druhu ovoce použitého pro výrobu destilátu.

1.7.2.2.3 Statický headspace metodou vyrovnaného tlaku

Ve headspace metodě vyrovnaného tlaku (Pressure Ballanced Systems) není alikvotní část z plynného prostoru nádoby odebrána nasátím, ale natlakováním nádoby. Po dokončení termostatování je nádoba se vzorkem natlakována plynem mobilní fáze na tlak, který je shodný s tlakem na hlavě kolony v GC. Následně je ventilem dočasně uzavřen přívod nosného plynu do systému (0,04–0,10 minuty) a směs nosného plynu a headspace plynné fáze z natlakované nádoby expanduje přes spojovací kapiláru do analytické kolony GC. Alikvotní množství

odebraného vzorku je závislé na tlaku mobilní fáze a době uzavření přívodu plynu. Předností této headspace metody je vyrovnání tlaků mobilní fáze v nádobce a na hlavě kolony, čímž nedochází při transportu vzorku z nádoby do GC k tlakovým změnám. Touto technikou je možné plynule řídit množství nadávkovaného vzorku v závislosti na době odebírání alikvotní části vzorku [49].



Obrázek 5: Headspace technika metodou vyrovnaného tlaku [49]

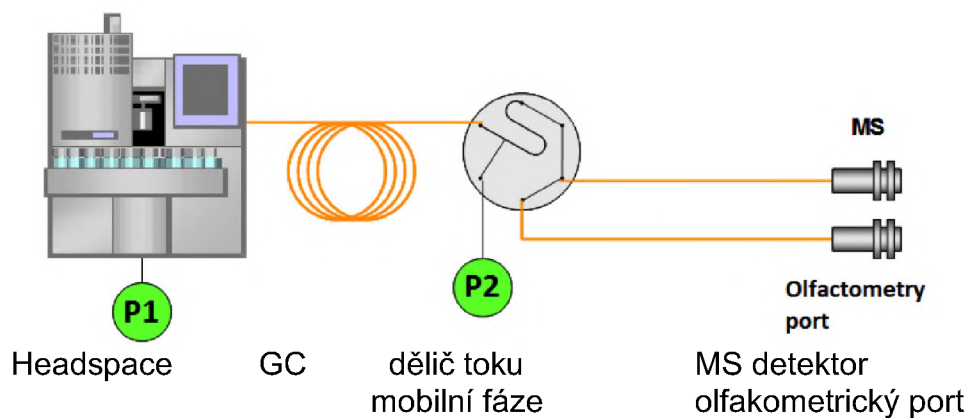
1.7.2.2.4 Statický headspace s dávkovací smyčkou

V headspace systému s dávkovací smyčkou je nádobka po dosažení rovnovážného stavu také natlakována nosným plynem, jako v systému s vyrovnaným tlakem, ale v dalším kroku se otevře cesta do dávkovacího ventilu, ve kterém se naplní smyčka plynné fází z nádoby. V posledním kroku se rotor dávkovacího ventilu otočí a obsah smyčky se nastříkne do plynového chromatografu [49].

1.7.3 Olfaktometrická analýza

V současné době není dostupná instrumentální technika, která by dokázala nahradit senzoričnou analýzu pomocí lidských smyslů. Proto je senzoričká analýza vůně a chuti vína stále nepostradatelnou součástí hodnocení kvality vína. Stanovení těkavých organických látek metodou plynové chromatografie dokáže detekovat a identifikovat jednotlivé přítomné sloučeniny přítomné ve vzorku, nedokáže ale popsat jejich vnímání lidskými smysly. Jedna z možností, jak rozšířit vypovídací hodnotu analýzy aroma metodou plynové chromatografie je

použití olfaktometrické analýzy (GC-O). Při olfaktometrické analýze je využívána stejná konfigurace GC nebo GCMS, jako pro běžné měření aroma, tj. nějaký typ headspace vzorkování s následnou separací na analytické koloně. Při olfaktometrické analýze se na výstupu z kolony efluent rozdělí do dvou proudů. Jeden směřuje do klasického FID nebo MS detektoru, zatímco druhá část je zavedena do zařízení mimo plynový chromatograf, do olfaktometrického portu pomocí tenké vyhřívané křemenné kapiláry. Kapilára je zakončena rozšiřujícím se nástavcem pro nosní díl. V nástavci je efluent promíchán se zvlhčeným vzduchem pro prevenci vysychání nosní sliznice. Pomocí paralelního zapojení lze zaznamenávat signál z GC detektoru a současně sensoricky hodnotit aroma přicházející do olfaktometrického portu. Některé systémy pro olfaktometrickou analýzu jsou vybaveny mikrofonem pro zaznamenání hlasu hodnotitele a joystickem pro zaznamenání intenzity aroma. Po skončení měření je možné navzájem překrýt chromatogram z GC s vizualizovaným audio záznamem pro propojení obou technik [54]. Na základě překryvu signálů se přiřadí látky z chromatogramu k audio. Příklad konfigurace GC-O analýzy a olfaktometrického portu jsou na obrázcích č. 6 a č. 7.



Obrázek 6: Schéma konfigurace instrumentace pro olfaktometrickou analýzu [55]



Obrázek 7: Sestava zařízení pro olfaktometrickou analýzu [55]

Villiere, A. a kol. [56] využívali spojení GC s olfaktometrickým portem pro analýzu aroma vína odrůdy Cabernet Franc. Byla použita technika HS-GCMS a FID ve spojení s olfaktometrickým portem. byly testovány různé způsoby zapojení pomocí Deanova přepínače nebo splitteru mobilní fáze.

1.8 Statistická analýza dat

1.8.1 Optimalizace podmínek extrakce

Výběr podmínek extrakce těkavých organických látek z vín pomocí SPME byl optimalizován pomocí metody centrálně kompozitního plánování (Central Composite Design, CDD) založené na metodě odezvové křivky (Respond Surface Methodology, RSM) včetně čtyř replikátů na centrální bod [57]. Metoda RSM sestává ze skupiny matematických a statistických metod, které jsou založeny přizpůsobení empirických modelů na experimentálně naměřená data. K tomu jsou využívány lineární nebo čtvercové polynomické funkce, které popisují studovaný systém a následně slouží k úpravě experimentálních podmínek pro jeho finální optimalizaci. Touto metodou byl testována optimální hodnota teploty a doby extrakce těkavých látek vzorku.

Po změření vzorků za modelových podmínek byla statisticky vypočítána jejich optimální hodnota, která byla dále použita po měření sady vzorků vín [31].

1.8.2 Interpretace vztahů mezi naměřenými soubory dat

Pro interpretaci vztahů mezi naměřenými daty pro sadu vzorků konvenčně vyrobených vín, vůči sadě naturálních vín byly provedeny statistickou metodou ortogonální projekce do latentních struktur (Orthogonal Projections to Latent Structures, OPLS). Metoda OPLS je využívána pro hodnocení multivariačních dat s cílem popsat vztah mezi souborem nezávisle proměnných X a závisle proměnných Y a maximalizovat mezi nimi korelaci [58].

Naměřené chromatogramy tvořily otisk prstu aromatických látek přítomných ve vzorcích. Pro popsání vztahů mezi otiskem prstů a typem konvenčního nebo naturálního vína byla použita metoda postupné vícenásobné regrese s redukcí rozměrnosti metodou ortogonální projekce do latentních struktur. Tato metoda je založena na principu částečné regrese nejmenších čtverců pomocí nelineárního iteračního algoritmu (NIPALS - Non-linear Iterative Partial Least Squares). Metoda OPLS byla navržena společností Trygg a Wold (Trygg and Wold 2002). Jedná se o úpravu algoritmu NIPALS PLS. Jeho cílem je zlepšit interpretaci PLS modelů oddělením systematické variace ze vstupního datového souboru X (matice s prediktory a subjekty), která nesouvisí se sadou odpovědí Y (matice se závislými proměnnými a subjekty) [53].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V experimentální část práce byla zaměřena na vývoj metody stanovení aroma profilu vína. Podle rešerše měření aromatických látek potravin a nápojů byla zvolena technika plynové chromatografie s plameno ionizačním detektorem pro stanovení kvantitativních parametrů a dále pomocí hmotnostního detektoru pro identifikaci sloučenin. Pro vzorkování byla zvolena metoda mikroextrakce na pevnou fázi, která spojuje přínos minimální přípravy vzorku, vyhovující citlivost a možnost automatizace měření velkého množství vzorků autosamplerem plynového chromatografu.

Celkem 78 vzorků konvenčně vyrobených a naturálních vín byly nakoupeny v běžné maloobchodní síti a přímo od vinařů. Kolekce vzorků byla zacílena na lahvovaná vína v kvalitativních úrovních „Jakostních vín odrudových“ a „Jakostních vín s přívlastkem“ [59]. Naturální vína od vinařů převážně klasifikována jako „Zemská“ vína, i když v cenové hladině odpovídají skupině vín „Jakostní s přívlastkem“, nebo i vyšší.

Vyvinutou analytickou metodou byly změřeny vzorky všech vín, vždy tři měření na vzorek. Dvě měření byla provedena metodou GC-FID a třetí měření bylo s detekcí hmotnostním spektrometrem. Získaná data byla statisticky vyhodnocena a byl okomentován výsledek experimentální části.

2.1 Vzorky a chemikálie

2.1.1 Vzorky bílých vín

Všechny vzorky vín pocházejí z České republiky. Vzorky bílých vín vyrobených konvenční metodou lze zařadit podle Zákona o vinohradnictví a vinařství č. 321/2004 Sb. s navazujícími vyhláškami do jednotlivých skupin. Vína byla zakoupena v běžné maloobchodní síti, aby reflektovala běžnou nabídku na trhu.

Naturální vína, které vinař z pohledu vinařského zákona zařadí do skupiny Zemských vín, musí splnit pouze základní parametry minimální cukernatosti 11 °NM a přirozený obsah alkoholu 8,3 % obj. Těchto kritérií dosahují i běžná základní vína na trhu. Pro potřeby této práce byly do skupiny naturálních vín zařazena taková vína, která vinař sám označuje jako naturální nebo autentická, nebo u kterých se používají technologické postupy, které nejsou obvyklé v konvenčním postupu výroby (eliminace postřiků, dlouhodobá macerace, minimální přídavky oxidu siřičitého, pouze hrubá filtrace). Většina naturálních vín v této studii byla od vinařů, kteří se této produkci věnují více let a lze předpokládat, že v české republice zastupují reprezentativní vzorek vína, které lze označovat jako naturální. Podrobnější třídění, jako materiál nádoby

pro kvašení nebo zrání vína nebyly v této práci zohledňovány. V kolekci naturálních vín jsou 3 vína vyrobená metodou kvevri, dále vína s různou dobou macerace a některá vína zrála v dubovém nebo akátovém sudu.

V souboru 78 vín je 49 zařazeno do konvenční výroby a 29 do naturálních vín. Z vinařské oblasti Čechy bylo 17 vín, a z oblasti Morava 61. Zastoupené byly ročníky 2013, 2015–2019. Kvůli menší nabídce naturálních vín na trhu byly do studie zařazeny různé odrůdy vín se záměrem pokrýt co nejvíce variabilitu v aroma profilu metodou otisku prstu. Soupis vzorků vín a zastoupení jednotlivých odrůd je uvedeno v tabulce č. 7.

Tabulka 7: Seznam vzorků a zastoupení odrůd

Vzorek č.	Konvenční víno (K)	Oblast Čechy (C)	Odrůda vína
	Naturální víno (N)	Oblast Morava (M)	
1	K	M	Müller Thurgau
2	K	M	Müller Thurgau
3	K	M	Müller Thurgau
4	K	M	Chardonnay
5	K	M	Veltlínské zelené
6	K	M	Ryzlink rýnský
7	K	M	Ryzlink rýnský
8	K	M	Veltlínské zelené
9	K	M	Veltlínské zelené
10	K	C	Rulandské šedé
11	K	C	Müller Thurgau
12	K	C	Ryzlink rýnský
13	K	C	Ryzlink rýnský
14	K	C	Muškát moravský
15	K	C	Ryzlink rýnský
16	K	C	Müller Thurgau
17	K	C	Ryzlink rýnský
18	K	C	Ryzlink rýnský
19	K	C	Müller Thurgau
20	N	C	Ryzlink rýnský
21	K	M	Ryzlink rýnský
22	K	M	Ryzlink rýnský
23	K	M	Chardonnay
24	K	C	Müller Thurgau
25	K	C	Bacchus
26	K	C	Muškát moravský
27	K	C	Sylvánské zelené
28	K	C	Rulandské bílé
29	K	M	Ryzlink rýnský
30	K	M	Veltlínské zelené
31	K	M	Chardonnay
32	K	M	Neuburské
33	K	M	Müller Thurgau
34	K	M	Ryzlink rýnský
35	K	M	Ryzlink rýnský
36	N	M	Cuvée
37	N	M	Cuvée
38	N	M	Cuvée
39	N	M	Chardonnay

Vzorek č.	Konvenční víno (K)	Oblast Čechy (C)	Odrůda vína
	Naturální víno (N)	Oblast Morava (M)	
40	N	M	Tramín červený
41	N	M	Chardonnay
42	N	M	Sauvignon
43	N	M	Cuvée
44	N	M	Ryzlink rýnský
45	N	M	Cuvée
46	K	M	Chardonnay
47	K	C	Ryzlink rýnský
48	K	M	Veltlínské zelené
49	N	M	Rulandské šedé
50	N	M	Rulandské šedé
51	K	M	Rulandské šedé
52	K	M	Veltlínské červené rané
53	K	M	Chardonnay
54	K	M	Müller Thurgau
55	K	M	Ryzlink rýnský
56	K	M	Ryzlink rýnský
57	N	M	Chardonnay
58	N	M	Chardonnay
59	N	M	Tramín Červený
60	N	M	Cuvée
61	K	M	Ryzlink rýnský
62	K	M	Sylvánské zelené
63	K	M	Veltlínské zelené
64	N	M	Sylvánské zelené
65	N	M	Müller Thurgau
66	K	M	Veltlínské zelené
67	K	M	Ryzlink rýnský
68	N	M	Neuburské
69	N	M	Veltlínské zelené
70	N	M	Chardonnay
71	N	M	Rulandské šedé
72	N	M	Veltlínské zelené
73	N	M	Cuvée
74	N	M	Sauvignon
75	N	M	Ryzlink vlašský
76	N	M	Cuvée
77	N	M	Sauvignon
78	K	M	Chardonnay

2.1.2 Použité chemikálie

- Demineralizovaná voda Mili-Q® (Merc KGaA, Darmstadt, Německo)
- Roztok standardu n-alkanové směsi (C8–C33), CPAchem, Stara Zagora, Bulharsko
- NaCl, p.a. (Lach-Ner s.r.o, Neratovice)
- Technické plyny – helium 4.6, vodík, dusík (Linde Gas a. s., Praha, Česká republika) a vzduch (z místního rozvodu).

2.2 Mikroextrakce tuhou fází v headspace uspořádání

2.2.1 Volba typu sorbentu SPME vlákna

Volba typu SPME vlákna byla zvolena doporučení výrobce pro pokrytí širokého spektra extrahovaných látek a podle Perestrelo R. a kol. [52], kteří testovali v techniku analýzy SPME ve spojení s GCMS pro analýzu těkavých organických látek v dužnině a slupce révy vinné. Porovnávali tyto typy tuhé fáze: PDMS, PDMS/DVB, DVB/CAR/PDMS, CAR/PDMS, CWDVB. Efektivita extrakce vyjádřená jako plocha GC píků pro analyty s karbonylovou skupinou, alkoholovou skupinou a monoterpeny byla nejvyšší u vlákna s tuhou fází DVB/CAR/PDMS. Pro další optimalizační kroky a vlastní analýzu vzorků bylo zvoleno vlákno DVB/CAR/PDMS (divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane) StableFlex 50/30 μm .

2.2.2 Optimalizace úpravy vzorků před extrakcí

Pro zvolení optimálních podmínek přípravy vzorku pro byl proveden experiment s různou úpravou vzorku před SPME extrakcí. Pro tento test byl připraven směsný vzorek ze tří různých bílých jakostních vín, které byly smíchány ve stejném poměru po 1/3 z každého vína. Pro směsný vzorek byly použity jakostní vína odrůdy Sauvignon, Ryzlink vlašský a Muškát moravský. Byly připraveny tři typy vzorku pro měření, jeden neředěný a dva ředěné. Pro první typ bylo napipetováno 10 ml neupraveného směsného vzorku a uzavřeno v 20 ml nádobce. Druhý vzorek byl naředěn demineralizovanou vodou v poměru víno:voda 1:3 a 10 mL naředěného vzorku bylo uzavřeno v 20 ml nádobce. Třetí vzorek byl naředěn 1:3 nasyceným roztokem NaCl, opět bylo použito 10 ml ředěného vzorku. Vzorky byly po SPME extrakci analyzovány metodou GC-FID a získané chromatogramy byly vyhodnoceny na celkový počet píků v chromatogramu (viz tabulka 8). Pro další měření byla zvolena varianta ředění vzorku nasyceným roztokem NaCl, která poskytovala při teplotě extrakce 85 °C největší počet detekovaných píků.

Tabulka 8: Optimalizace přípravy vzorku pro měření

Úprava vzorku a teplota extrakce	Celkový počet píků
Víno neředěné, extrakce 50 °C	65
Víno neředěné, extrakce 85 °C	74
Víno ředěné vodou 1:3, extrakce 50 °C	62
Víno ředěné vodou 1:3, extrakce 85 °C	68
Víno ředěné 30 % NaCl 1:3, extrakce 50 °C	64
Víno ředěné 30 % NaCl 1:3, extrakce 85 °C	92

2.3 Plynová chromatografie

Pro chromatografickou analýzu byly použity plynové chromatografy výrobce Shimadzu, a to model GC-2010 s detektorem FID a GC Shimadzu model GC-2010 s hmotnostním detektorem QP 2010 Plus, oba obsluhované společným autosamplerem PAL-Combi s nástavcem pro SPME.

2.3.1 Podmínky GC-FID

Separace na GC-FID probíhala na kapilární koloně SLB-5MS o délce 30 m, vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 μm . Jako nosný plyn bylo použito helium. Teplota injektoru byla 200 °C, teplotní program 40 °C po dobu 3 min., dále zahřívání rychlostí 5 °C za minutu na konečnou teplotu 200 °C s udržením plata 25 min, lineární rychlost nosného plynu 30 cm/s, splitovací poměr 1:20. Celková doba analýzy 50 min. Plamenově-ionizační detektor byl vyhříván na 220 °C, průtok vzduchu byl nastaven na 400 ml/min a vodíku na 40 ml/min. Lineární retenční indexy pro jednotlivé píky byly vypočteny pomocí retenčních homologické řady *n*-alkanů (C8-C33) analyzovaných za stejných podmínek jako vzorky.

2.3.2 Podmínky GC-MS

Separace na GCMS probíhala na kapilární koloně SLB-5MS o délce 30 m, vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 μm . Jako nosný plyn bylo použito helium. Teplota injektoru byla 200 °C, teplotní program pece 40 °C po dobu 3 min., dále zahřívání rychlostí 5 °C za minutu na konečnou teplotu 200 °C s udržením plata 15 min., lineární rychlost nosného plynu 30 cm/s, splitovací poměr 1:20. Pracovní podmínky MS detektoru: solvent delay 0–5,5

min., scan 35–500 m/z v režimu elektronové ionizace (EI) 70 eV. Celková doba analýzy 50 min. Lineární retenční indexy (LRI) pro jednotlivé píky byly vypočteny pomocí retenčních časů homologické řady n -alkanů (C8–C33) analyzovaných za stejných podmínek jako vzorky. Jednotlivé sloučeniny byly identifikovány porovnáním průměrného spektra píku s referenčními spektry z knihoven FFNSC 2, NIST 11. Potvrzení identity látek bylo provedeno porovnáním LRI vypočtených a publikovaných (dostupné v databázi National Institute of Standards and Technology) [60]

2.3.3 Opakovatelnost měření

Na optimalizované extrakční metodě byla změřena opakovatelnost na pěti měření stejného vzorku vína. Byla spočítána výběrová směrodatná odchylka pro plochu píku a spočítána RSD s výsledkem 1,8 % pro pík s retenčním časem 19,9 min. na chromatogramu z GC-FID.

2.3.4 Porovnání retenčních časů přímým nástřikem a headspace SPME technikou

Pro stanovení retenčních indexů látek byly proměřeny homologické řady n -alkanů, které byly do GC dávkovány přímým nástřikem roztoku. Pro ověření shodnosti retenčních časů při technice přímého nástřiku roztoku a nástřiku pomocí headspace SPME byl proveden doplňující test. Do uzavřené headspace nádoby bylo mikrostříkačkou nadávkováno 100 μ l roztoku n -alkanů a vzorek byl změřený metodou headspace SPME. Nebyl zaznamenán rozdíl v retenčních časech alkanů při použití přímého nástřiku nebo techniky headspace SPME.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

V kapitole výsledky a diskuze je popsán souhrn vývoje a optimalizace analytické metody pro měření těkavých látek v aroma profilu bílých vín pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizační a hmotnostní detekcí. Chromatogramy z GC-FID byly vyhodnoceny pro zjištění celkového počtu píků a jejich ploch. Naměřené chromatogramy se spektry z GC-MS byly použity na identifikaci látek, důležitých pro rozlišení postupu výroby vína. Dále jsou uvedeny a zhodnoceny výsledky statistické metody pro rozřídění konvenčně vyrobených a naturálních vín na základě jejich aroma profilu.

3.1 Analýza aroma profilu vína

Cílem bylo vyvinout metodu měření aroma profilu bílých vín pro detekci co největšího počtu sloučenin ve vzorcích. Výsledkem vývoje metody mělo být pokrytí co největší variability aroma profilů vína. Záměrem využití optimalizované metody bylo rozlišení vzorků vín s odlišnými výrobními postupy mezi dvě skupiny, a to konvenčně vyrobená vína a naturální vína. Celkem bylo do experimentu zařazeno 78 vzorků lahvových bílých vín, z toho 49 vín původem z konvenční výroby a 29 souhrnně označované jako naturální výroba. Byla shromážděna různorodá kolekce vzorků, se zastoupením vín z vinařských oblastí Čech i Moravy, od různých výrobců a se zastoupením různých odrůd. Pro extrakci těkavých látek ze vzorků byla použita metoda HS-SPME. Jako analytická koncovka byla zvolena metoda GC-FID pro zjištění celkového počtu píků ve vzorku a jejich ploch a dále metoda GC-MS pro možnost identifikace cílených látek pro rozlišení konvenčních a naturálních vín. Pro analýzu metodou GC-FID byly změřeny dvě samostatné analýzy z jednoho vzorku vína a pro identifikaci metodou GC-MS byl použitý třetí replikát stejného vzorku. Naměřené retenční časy z GC-FID pro jednotlivé látky byly přepočítány na retenční indexy pro sjednocení všech měření a také pro přiřazení sloučenin k měření metodou GC-MS. V souhrnu bylo ze všech vzorků detekováno 639 unikátních píků, zaznamenaných za daných podmínek metodou GC-FID. Každému z detekovaných píků byl vypočítán retenční index podle Van den Doola.

3.2 Optimalizace teploty a doby extrakce metodou SPME

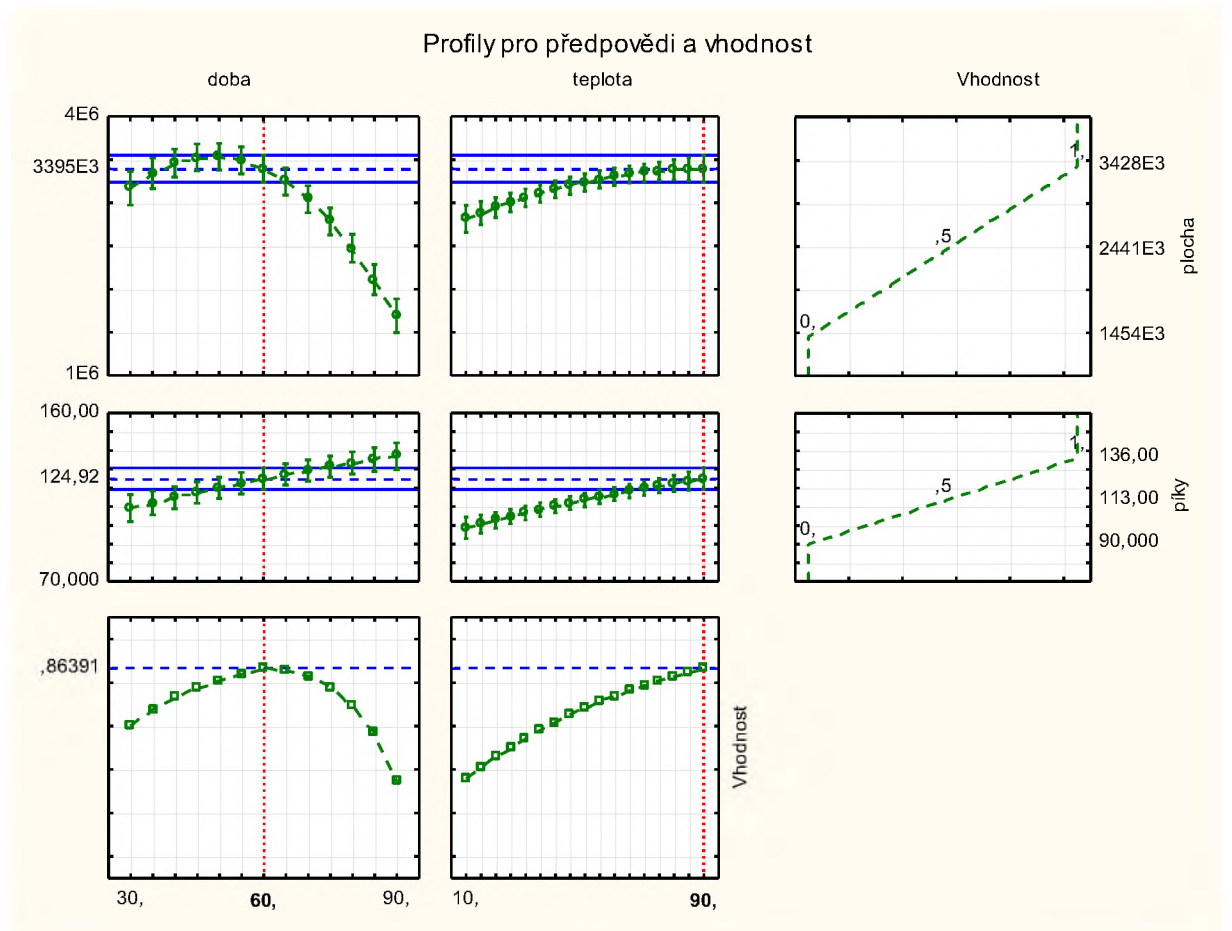
Pro optimalizaci vhodné doby a teploty extrakce technikou HS-SPME byla pro návrh experimentu použita metoda centrálně kompozitního plánování (Central Composite Design, CDD), vyhodnocení bylo založeno na metodě odezvové křivky (Respond Surface Methodology, RSM). Celkem bylo provedeno 12 analýz včetně čtyř replikátů na centrální bod (viz tabulka č. 9). Teplota extrakce byla testována od 10 °C do 90 °C a doba extrakce byla

testována od 30 min. do 90 min. Po provedení všech dvanácti analýz byly vyhodnoceny celkové plochy a počty píků. Do celkové plochy píků nebyly zahrnuty plochy v chromatogramu do času 3,00 minut, kdy se eluuje pík etanolu, který má oproti ostatním analytům násobně větší plochu. Etanol nebyl cílenou látkou této práce, a pro analýzu aroma profilu není významný. Výsledky měření pro optimalizaci doby a času extrakce jsou v tabulce č. 9.

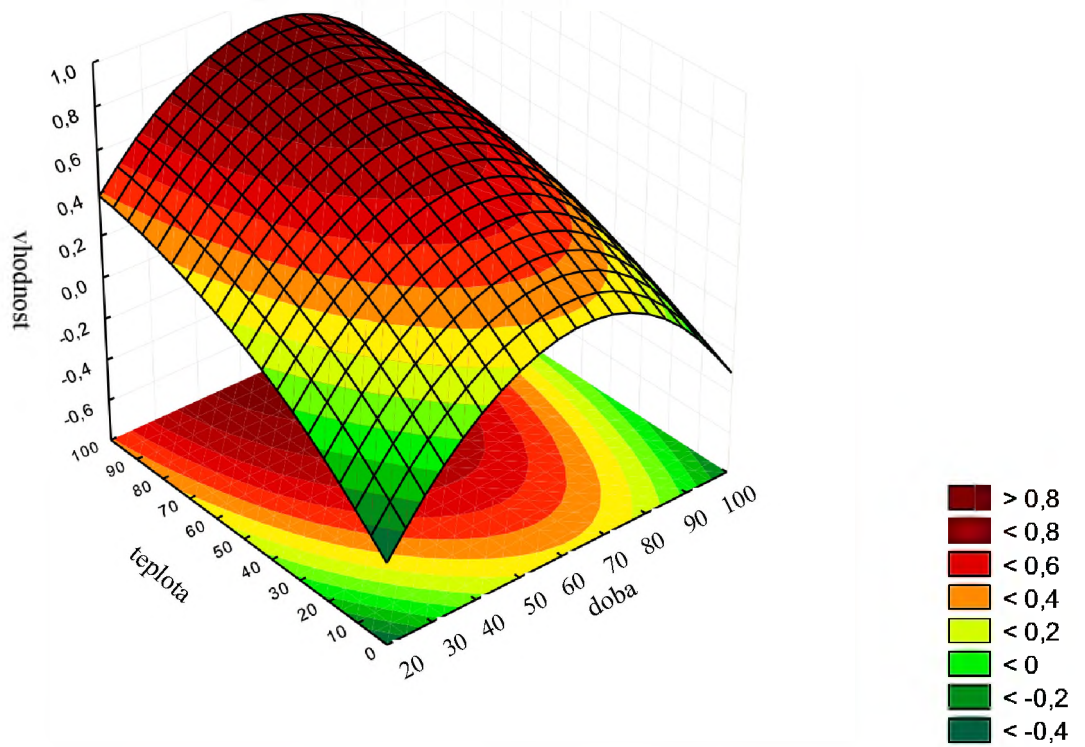
Tabulka 9: Optimalizace teploty a času extrakce

Č.	Pokus	Doba	Teplota	Celková plocha píků	Počty píků
1	1	30	10	2 393 963	90
2	2	30	90	3 150 124	107
3	5	30	50	2 824 929	101
4	7	60	10	2 665 551	94
5	8	60	90	3 428 398	128
6	9C	60	50	3 303 742	114
7	10C	60	50	3 214 841	116
8	11C	60	50	3 275 721	111
9	12C	60	50	3 266 139	115
10	3	90	10	1 453 595	108
11	4	90	90	1 677 787	136
12	6	90	50	1 602 326	121

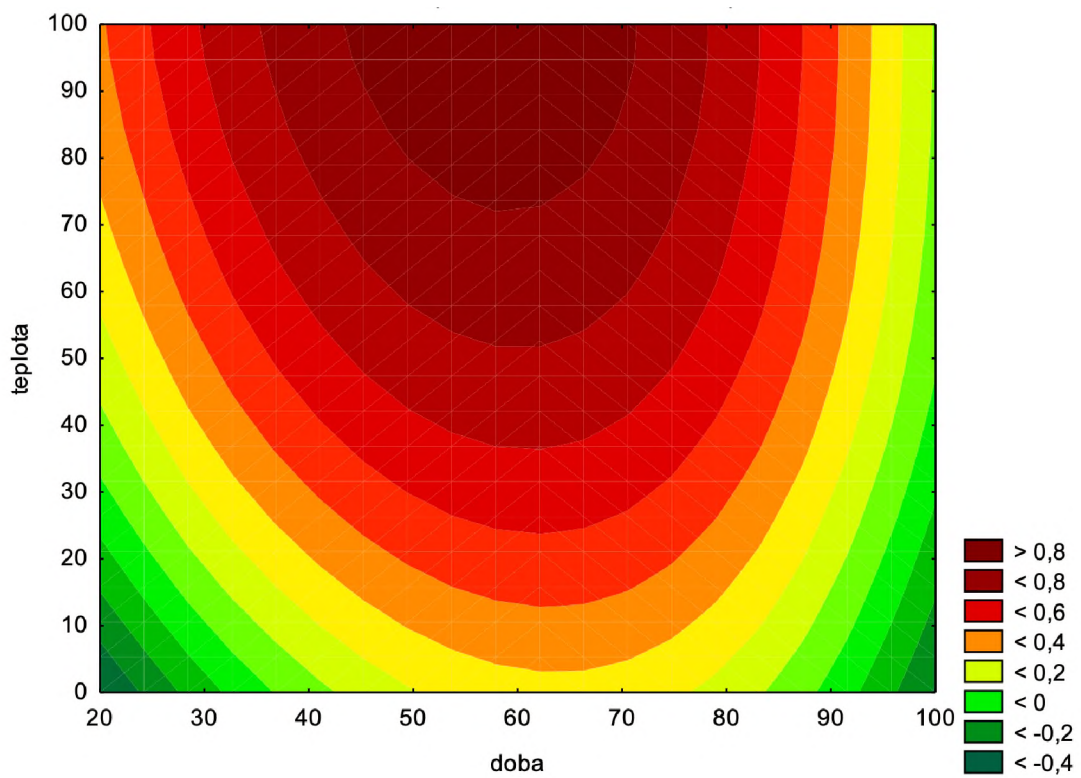
Naměřené hodnoty celkové plochy a počtu píků byly spolu s dobou a teplotou termostatování použity pro vypočítání optimálních podmínek extrakce těkavých látek. Vyhodnocení proběhlo ve statistickém softwaru Statistica 12 od společnosti StatSoft. Z naměřených dat byly sestrojeny profily pro předpovědi a vhodnosti pro faktory počet píků a celková plocha píků. Z profilu předpovědi pro teplotu míra vhodnosti stoupá od 10 °C až do 90 °C, kde je její maximum. Protože je matricí vzorku voda, nelze dále zvyšovat teplotu kvůli limitaci bodem varu vody. Proto byla pro teplotu vyhodnocena jako optimální hodnota termostatování 90 °C. Pro dobu extrakce vyšla nejvhodnější hodnota 60 minut, při které je optimum vhodnosti sestrojeného profilu. Profily pro předpovědi a vhodnost jsou na obrázku č. 8. Graf vhodnostního profilu v třírozměrném zobrazení je na obrázku č. 9. Graf vhodnostního profilu v dvou rozměrném zobrazení je na obrázku č. 10.



Obrázek 8: Optimalizace teploty a času extrakce na kombinaci maximálního počtu a plochy píků



Obrázek 9: Graf vhodnosti počtu a plochy píků v projekci 3D.



Obrázek 10: Graf vhodnosti pro počet a plochu píků v projekci 2D.

3.3 Postup vyhodnocení vzorků změřených metodou GC-FID

Celkem bylo analyzováno 78 vzorků bílých vín, z toho 49 vín z konvenční výroby a 29 naturálních vín. Každý vzorek byl analyzován ve třech opakováních. Dvě měření byla provedena metodou GC-FID a jedno metodou GC-MS.

Pro zmenšení vlivu náhodné chyby byla obě měření vzorků z GC-FID zahrnuté do následného statistického vyhodnocení. Pro statistické vyhodnocení bylo celkem použito 156 měření z GC-FID. Vzorky byly analyzovány ve čtyřech sadách a ke každé byl změřený standard homologické řady uhlovodíků C8–C33. Pro jednotlivé píky v chromatogramech byly vypočítány retenční indexy podle Van den Doola od času analýzy 3,00 min do 50 min. V první sadě byly vzorky č. 1–30, 36–46, ve druhé sadě vzorky 31–35, 46–50, ve třetí sadě vzorky 5–60, a ve čtvrté sadě vzorky 61–78. Hodnoty retenčních časů a retenčních indexů jsou uvedeny pro jednotlivé sady vzorků v tabulkách č. 10, 11, 12, 13.

Po přepočítání retenčních časů na retenční indexy byla vypracována celková tabulka vzorků změřených metodou GC-FID ze všech měření, kde v řádcích jsou jednotlivá měření a ve sloupcích jsou vypočítané retenční indexy pro všechny píky přítomné v celém souboru vzorků s příslušnými plochami. Pokud v chromatogramu z daného měření nebyl některý z píků detekován, byla plocha píku označena nulovou hodnotou. Vlastní statistické vyhodnocení probíhalo ve statistickém softwaru, viz kapitola 3.4.

Průměrný počet píků v chromatogramu pro celý soubor dat byl 111. Pro konvenční vína byl průměrný počet píků 118, pro naturální vína 99.

Průměrná součet plochy všech píků v chromatogramu pro celý soubor dat byl 1 797 449 mV. Průměrný součet plochy konvenčních vín byl 1 798 698 mV, průměrný součet plochy naturálních vín byl 1 798 655 mV.

Tabulka 10: Retenční časy *n*-alkanů z dat GC-FID s retenčními indexy pro vzorky 1–30, 36–45

Sada vzorků 1 (1–30, 36–45)			
Název alkanu	Počet uhlíků	Retenční časy FID (min.)	Retenční indexy
<i>n</i> -oktan	8	7,154	800
<i>n</i> -nonan	9	10,422	900
<i>n</i> -dekan	10	13,806	1000
<i>n</i> -undekan	11	17,058	1100
<i>n</i> -dodekan	12	20,119	1200
<i>n</i> -tridekan	13	22,989	1300
<i>n</i> -tetradekan	14	25,687	1400
<i>n</i> -pentadekan	15	28,23	1500
<i>n</i> -hexadekan	16	30,632	1600
<i>n</i> -heptadekan	17	32,908	1700
<i>n</i> -oktadekan	18	35,07	1800
<i>n</i> -nonadekan	19	37,445	1900
<i>n</i> -ikosan	20	40,499	2000

Tabulka 11: Retenční časy *n*-alkanů z dat GC-FID s retenčními indexy pro vzorky 31–35, 46–50

Sada vzorků 2 (31–35, 46–50)			
Název alkanu	Počet uhlíků	Retenční časy FID (min.)	Retenční indexy
<i>n</i> -oktan	8	7,157	800
<i>n</i> -nonan	9	10,431	900
<i>n</i> -dekan	10	13,819	1000
<i>n</i> -undekan	11	17,073	1100
<i>n</i> -dodekan	12	20,136	1200
<i>n</i> -tridekan	13	23,008	1300
<i>n</i> -tetradekan	14	25,707	1400
<i>n</i> -pentadekan	15	28,252	1500
<i>n</i> -hexadekan	16	30,655	1600
<i>n</i> -heptadekan	17	32,933	1700
<i>n</i> -oktadekan	18	35,099	1800
<i>n</i> -nonadekan	19	37,486	1900
<i>n</i> -ikosan	20	40,56	2000

Tabulka 12: Retenční časy *n*-alkanů z dat GC-FID s retenčními indexy pro vzorky 51–60

Sada vzorků 3 (51–60)			
Název alkanu	Počet uhlíků	Retenční časy FID (min.)	Retenční indexy
<i>n</i> -oktan	8	7,191	800
<i>n</i> -nonan	9	10,464	900
<i>n</i> -dekan	10	13,851	1000
<i>n</i> -undekan	11	17,105	1100
<i>n</i> -dodekan	12	20,169	1200
<i>n</i> -tridekan	13	23,04	1300
<i>n</i> -tetradekan	14	25,738	1400
<i>n</i> -pentadekan	15	28,281	1500
<i>n</i> -hexadekan	16	30,684	1600
<i>n</i> -heptadekan	17	32,962	1700
<i>n</i> -oktadekan	18	35,123	1800
<i>n</i> -nonadekan	19	37,511	1900
<i>n</i> -ikosan	20	40,592	2000

Tabulka 13: Retenční časy *n*-alkanů z dat GC-FID s retenčními indexy pro vzorky 61–78

Sada vzorků 4 (61–78)			
Název alkanu	Počet uhlíků	Retenční časy FID (min.)	Retenční indexy
<i>n</i> -oktan	8	7,186	800
<i>n</i> -nonan	9	10,451	900
<i>n</i> -dekan	10	13,834	1000
<i>n</i> -undekan	11	17,087	1100
<i>n</i> -dodekan	12	20,147	1200
<i>n</i> -tridekan	13	23,017	1300
<i>n</i> -tetradekan	14	25,714	1400
<i>n</i> -pentadekan	15	28,255	1500
<i>n</i> -hexadekan	16	30,657	1600
<i>n</i> -heptadekan	17	32,933	1700
<i>n</i> -oktadekan	18	35,094	1800
<i>n</i> -nonadekan	19	37,473	1900
<i>n</i> -ikosan	20	40,535	2000

3.4 Rozlišení konvenčně a naturálně vyrobených vín statistickou analýzou profilu těkavých látek

3.4.1 Příprava dat pro statistické hodnocení modelem OPLS

Před statistickou analýzou byly vyhodnoceny individuální chromatogramy GC-FID a byly vypočítány retenční indexy pro jednotlivé píky. Získaná data byla převedena na matici X ($r \times c$) obsahující řádky r (jednotlivá měření) a sloupce c (vypočítané retenční indexy píků v chromatogramech s jednotlivými plochami píků). Matice byla náhodně rozdělena na dvě části: kalibrační dataset a validační dataset. Ve výsledném modelu bylo 114 měření použito pro kalibraci modelu, 42 pro validaci modelu.

OPLS zahrnuje procesy vícenásobné lineární regrese, které kvantifikují vztah mezi X (matice s prediktory a subjekty) a Y (matice se závislými proměnnými a subjekty). Jako subjekty jsou zde vzorky vína, resp. jednotlivé analýzy. V případě matice X jsou prediktory jednotlivé píky charakterizované retenčním indexem a plochou, to platí pro oba datasety (kalibrační i validační). V případě kalibračního datasetu byly jako závislé proměnné v matici Y zvoleny logaritmy pravděpodobnostního poměru (LLR), což je vyjádření pravděpodobnosti, že daný subjekt (v našem případě vzorek vína) je daný typ vína (buď konvenční nebo naturální) nebo to není daný typ vína. Do validačního datasetu tato informace vložena nebyla. Výpočet hodnot LLR byl proveden podle rovnice (5). Aktuální hodnoty LLR jsou teoreticky rovny $-\infty$ nebo $+\infty$, avšak pro praktické vyhodnocení byly zvoleny kladné či záporné číselné hodnoty.

$$LLR = \ln \left(\frac{\text{pravděpodobnost, že se jedná o daný druh vína}}{\text{pravděpodobnost, že se nejedná o daný druh vína}} \right) \quad (5)$$

Ilustrativní výpočet aktuální hodnoty LLR, pro oba případy, že se jedná či nejedná např. o víno označené jako naturální, je uveden v rovnici (6). Kladná hodnota N_LLR poukazuje na to, že se jedná podle skutečnosti o víno naturálního typu, záporná hodnota N_LLR znamená, že se nejedná o víno naturálního typu. Tato informace byla vložena do kalibračního datasetu pro každé měření, tzn. u naturálních vín se jednalo o kladnou hodnotu (vždy stejnou) a u konvenčních vín o zápornou hodnotu (také vždy stejnou). Podobně bylo postupováno v případě proměnné C_LLR (obsahuje informaci o tom, zda se jedná o konvenční víno či nikoliv).

$$N_LLR = \ln \left(\frac{\text{pravděpodobnost, že se jedná o naturální víno}}{\text{pravděpodobnost, že se nejedná o naturální víno}} \right)$$

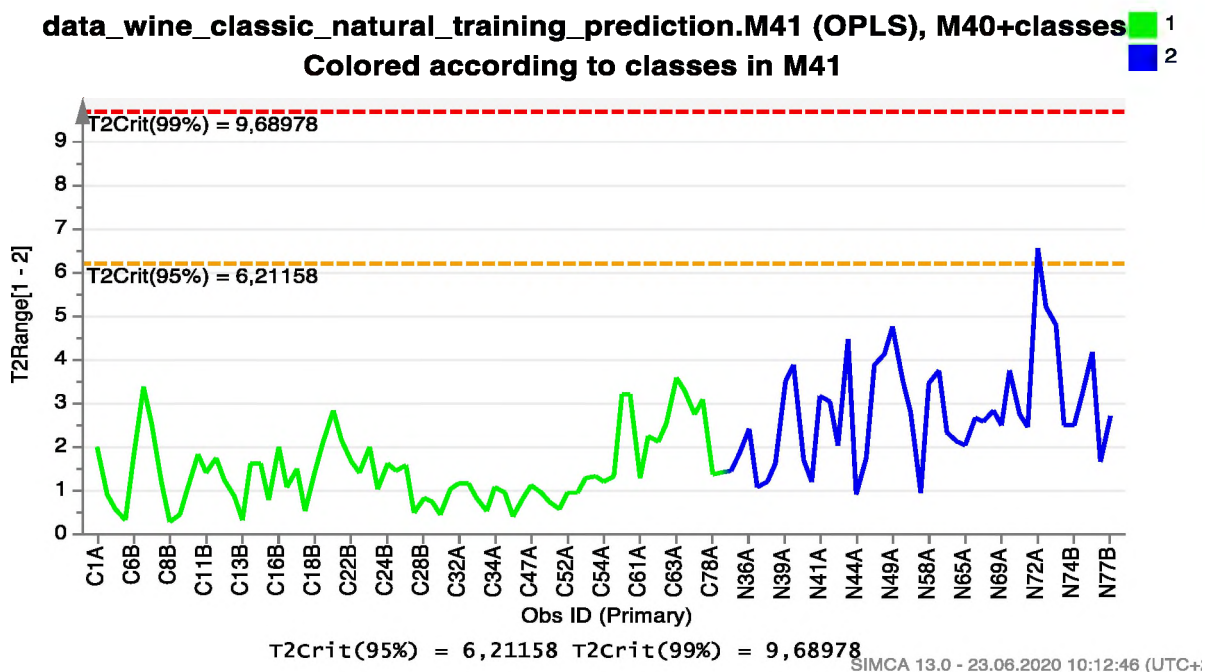
$$N_LLR = \ln \left(\frac{0,999999}{0,000001} \right) = 13,816 \quad \text{nebo} \quad N_LLR = \ln \left(\frac{0,000000001}{0,999999999} \right) = -20,723 \quad (6)$$

3.4.2 Tvorba kalibračního modelu

Pro interpretaci vztahů mezi chromatografickými daty a konvenčními nebo naturálními víny byla použita multivariační regrese se snížením rozměrů - ortogonální projekce do latentních struktur (OPLS). Vyhodnocení bylo provedeno pomocí statistického softwaru SIMCA verze 13.0, výrobce Sartorius Stedim Data Analytics AB (Umeå, Švédsko).

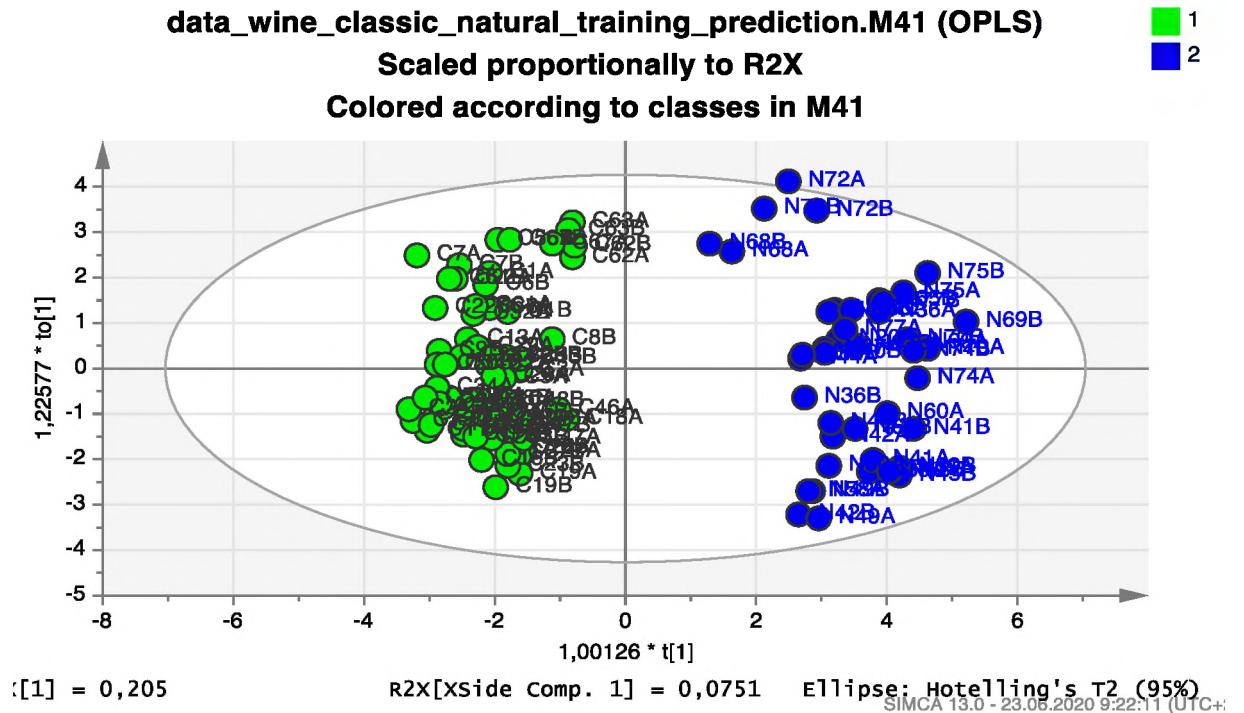
Chromatografická data (viz 3.4.1) byla transformována, aby bylo dosaženo symetrické distribuce. S použitím multivariačního *t*-testu (Hotelling's T^2 statistics) a statistiky důležitosti proměnné (Variable Importance Statistics, VIP) došlo k oddělení nekorelovaných dat.

Graf Hotellingovy statistiky (obrázek č. 11) zobrazuje vzdálenost od počátku v rovině modelu pro každé vybrané pozorování. Hodnoty větší než 95% hranice spolehlivosti jsou podezřelé a hodnoty větší než 99% hranice spolehlivosti lze považovat za závažné. Hodnota daleko nad kritickými limity indikuje, že pozorování je daleko od ostatních pozorování ve vybraném rozsahu a může model negativně ovlivnit. Tato pozorování byla z kalibračního datasetu vyjmuta, byla odstraněna informace o typu vína (LLR) a poté byla tato pozorování začleněna do validačního datasetu. V grafu sestrojeném pro kalibrační model spadaly všechny výsledky kromě jednoho měření do 95 % hranice spolehlivosti. Jediný výsledek byl těsně za hranicí 95 %. Statistika VIP byla použita k testování relevance prediktorů. Z celkového počtu 640 prediktorů zůstalo ve výsledném modelu 191 prediktorů.



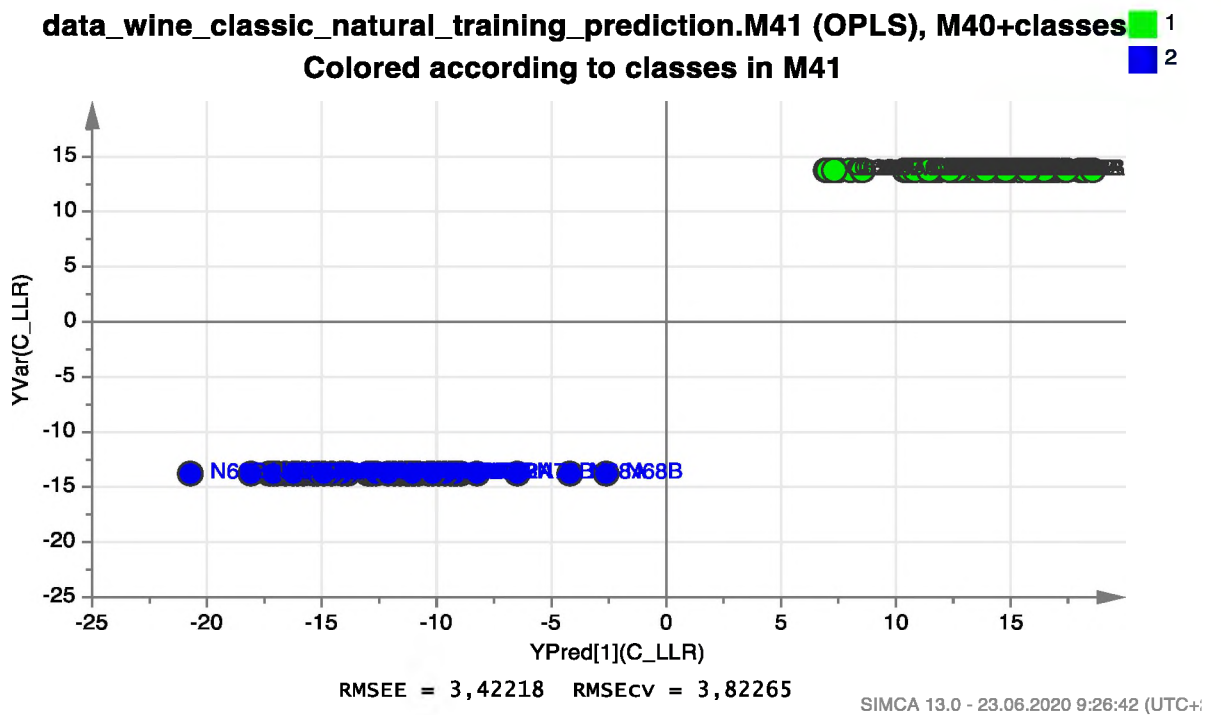
Obrázek 11: Graf Hottelingovy statistiky výsledného kalibračního modelu

OPLS rozděljuje variabilitu prediktorů na dvě skupiny: komponenty vztážené k Y, nazývané prediktivní a komponenty kolmé k Y, nazývané ortogonální. Informace z prediktorů a závisle proměnných, co se týkaly typu vína, byly uloženy do prediktivní komponenty. Ortogonální složka se vztahují k variabilitě vysoce korelovaných prediktorů. Na obrázku 12 je graf skóre kalibračního modelu prediktivní komponenta (osa x, popisuje rozlišení pozorování) vs. ortogonální komponenta (osa y, variace mezi jednotlivými pozorováními uvnitř skupiny). Graf byl sestaven v softwaru SIMCA z pozorování, které byly začleněny do kalibračního datasetu. Vzorky konvenčních vín v modelu jsou označeny písmenem C (zelené body), naturální vína písmenem N (modré body). Z rozložení jednotlivých bodů v grafu je zřejmé, že se modelem podařilo navzájem rozlišit vzorky konvenčních a naturálních vín z kalibračního datasetu do dvou skupin.

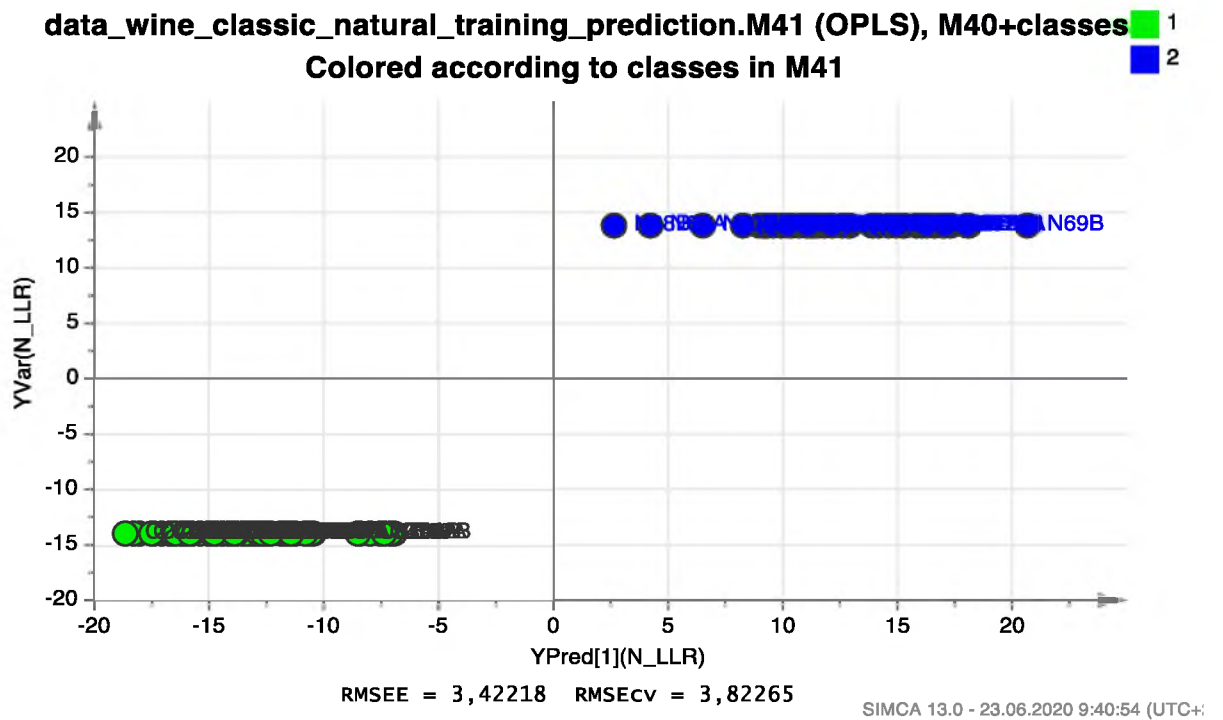


Obrázek 12: Graf skórů kalibračního modelu (software SIMCA)

Na obrázcích 13-14 jsou grafy pozorovaných hodnot LLR vs. předpovězených hodnot LLR. Tyto závislosti potvrdily funkčnost kalibračního modelu pro vzorky z kalibračního datasetu.



Obrázek 13: Logaritmus pravděpodobnostního poměru (LLR) pro zadané hodnoty k hodnotám predikovaným pro konvenční vína z kalibračního datasetu.



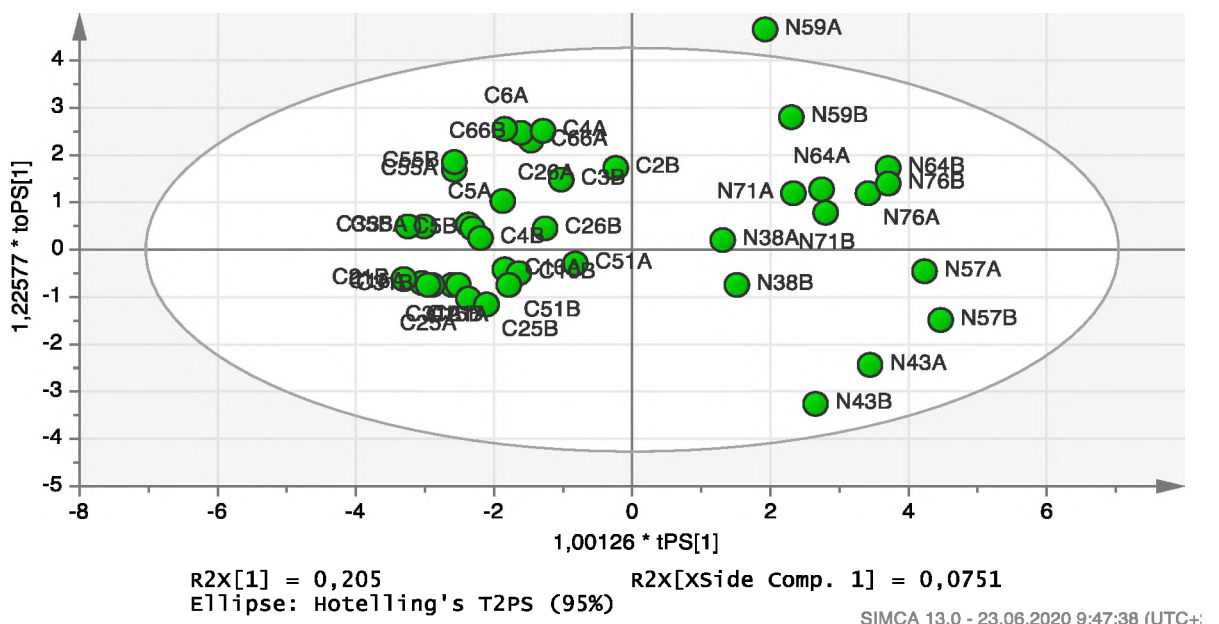
Obrázek 14: Logaritmus pravděpodobnostního poměru (LLR) pro zadané hodnoty k hodnotám predikovaným pro naturální vína z kalibračního datasetu.

3.4.3 Validace kalibračního modelu

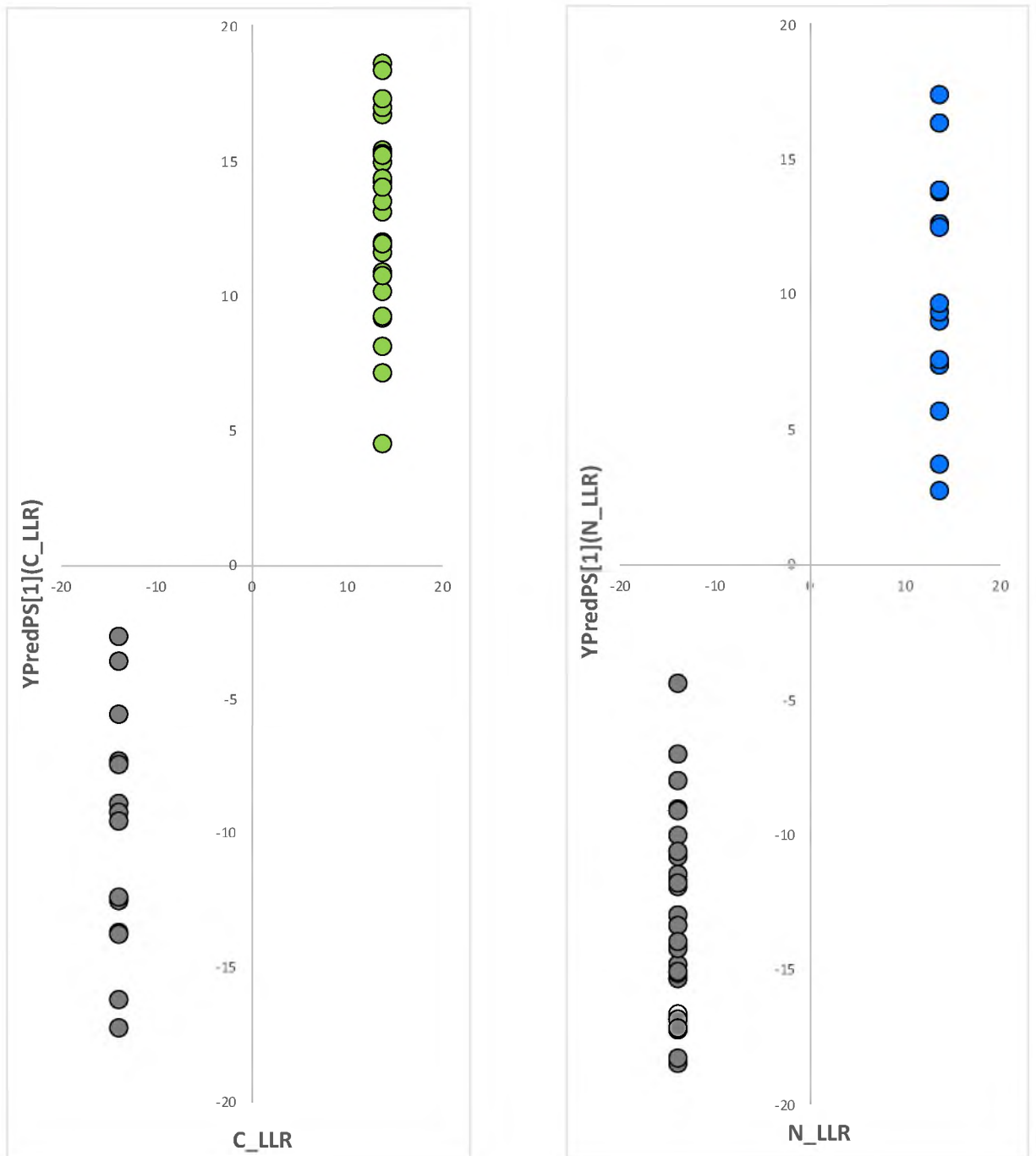
Pro validaci predikce statistického modelu byl použitý dataset 42 vzorků konvenčních i naturálních vín, které nebyly zařazeny do souboru kalibračních vzorků. Pro predikční model byly tyto vzorky neznámé. Výsledný predikovaný graf skóru je na obrázku č. 15.

Všechny vzorky konvenčních i naturálních vín byly rozřazeny do dvou skupin Modelem vypočítány hodnoty C_LLRL a N_LLRL pro pozorování začleněné do validačního datasetu. Poté byly k jednotlivým pozorováním přiřazeny také skutečné hodnoty C_LLRL a N_LLRL a z těchto hodnot byly vytvořeny grafy (obrázek č. 16). Vzorky, které mají aktuální LLR i predikovaný LLR v souřadnicích [+,+], jsou modelem správně zaříděny do skupiny konvenčních nebo do skupiny naturálních vín. Vzorky, které mají aktuální LLR i predikovaný LLR v souřadnicích [-,-], jsou modelem správně zaříděny mimo skupinu konvenčních, resp. naturálních vín. Pokud by se v grafech objevily pozorování v souřadnicích [+,-] nebo [-,+], jednalo by se o špatně zařazené vzorky. Z grafů je patrné, že žádný ze zkoumaných objektů validačního datasetu nebyl modelem vyhodnocen jako falešně pozitivní nebo falešně negativní.

a_wine_classic_natural_training_prediction.M41 (OPLS), M40+classes, PS-data_w Scaled proportionally to R2X



Obrázek 15: Validace statistického modelu Score Scatter Plot



Obrázek 16: Závislost predikovaných hodnot LLR na pozorovaných hodnotách pro konvenční vína na grafu vlevo ● a naturální vína na grafu vpravo ●.

Vhodnost modelu pro predikci naturálního vs. konvenčního způsobu výroby bílého vína byla ověřena také hodnotami korelačních koeficientů výsledného OPLS modelu (tabulka 14). Složený korelační koeficient pro predikované hodnoty je 0,9188, což potvrzuje vysokou spolehlivost predikce. Vysoká hodnota predikovaného R^2 dále ukazuje, že model není tzv. přeplněný. Přeplnění modelu (overfitting) je stav, kdy statistický model spíše popisuje náhodné

chyby v datech než vztahy mezi proměnnými. K tomuto problému dochází, když je model příliš složitý. Přeplněné modely produkují vysoké hodnoty R2, ale nízké hodnoty predikovaných R2 (v tabulce hodnota Q2). Přeplnění regresního modelu tedy snižuje jeho zobecnění mimo původní datový soubor a model následně špatně předpovídá neznámé vzorky.

Tabulka 14: Hodnoty korelačního koeficientu pro statistický model

Components		R2(cum) progression (R2 modelu)	Q2(cum) progression (predikovaný R2, po cross validaci)
Total	Comp[1+1]	0,936654	0,918806
Comp[1+0]	Comp[1+0]	0,912966	0,905297
Comp[1+1]	Comp[1+1]	0,936654	0,918806

3.5 Postup identifikace významných látek

Chromatogramy se spektry, změřené metodou GC-MS, byly použity pro identifikaci sloučenin, které měly nejvýznamnější vliv na predikci zařazení vína mezi konvenční nebo mezi naturální. Statistická významnost prediktorů na predikci typu vína byla určena podle hodnot regresních koeficientů z vícenásobné regresní analýzy.

Pro porovnatelnost chromatogramů z GC-FID a GC-MS byly proměřeny homologické řady uhlovodíků C8–C33, a vypočítány retenční indexy podle Van den Doola, viz. tabulky č. 15-18. Vlastní identifikace látek byla provedena pomocí porovnání MS spektra píku s knihovnými spektry a současně byl kontrolován retenční index stanovovaného píku vůči retenčním indexům z databáze NIST [60]. Tímto způsobem byly vyhodnoceny látky s největší důležitostí pro predikci konvenčních a naturálních vín. Tabulka identifikovaných těkavých látek z obou druhů vín metodou GC-MS je v tabulce č. 19. Sloučeniny statisticky významné pro predikci obou typů vín byly vybrány podle hodnot regresních koeficientů významných prediktorů ve vztahu k proměnné Y, jejichž absolutní hodnota představuje změnu proměnné Y (typ vína), když se proměnná X (prediktor) mění od 0 do 1, v kódovaných jednotkách.

Ze 34 neznámých látek bylo možné touto metodou identifikovat 30 látek, které patří do skupin látek esterů, alkoholů, terpenoidů a norisoprenoidů a dalších. Pro potvrzení správnosti identifikace byly nalezené sloučeniny porovnány s jinými pracemi, zkoumajícími aroma profil vína.

V práci Antalick a kol. [41] se zabývali vývojem, validací a aplikací specifických metod pro kvantitativní stanovení esterů ve víně metodou HS-SPME s analýzou GC-MS. Vzorke pro analýzu byly původem z různých ročníků Bordeaux a Côtes du Rhône. V uvedené práci stanovovali celkem 32 různých esterů v aromatu vína. Při porovnání nalezených esterů ve studii Antalick a kol. s identifikovanými látkami z této práce byla nalezena shoda u sedmi nalezených látek, a to Ethyl isobutyryát, Isobutyl acetát, 1-Hexyl acetát, Ethyl heptanoát, Ethyl oktanoát, Isoamyl hexanoát, Phenylethyl acetát.

Ve studii od Prestrelo a kol. [52] se zabývali stanovením těžkých látek v bobulích a hroznech révy vinné metodou HS-SPME a GC-MS. Stanovovali látky ze skupiny monoterpenů, seskviterpenů, norisoprenoidů, alkoholů, karbonylových sloučenin a organických kyselin. Ze skupiny alkoholů byla nalezena shoda u 1-heptanolu a 2-fenylethylalkoholu. Ze skupiny terpenoidů byl této práci identifikován limonen, Linalool oxid. Z norisoprenoidů byl v této práci nalezen TDN izomer.

Tabulka 15: Retenční časy *n*-alkanů z dat GC-MS s retenčními indexy pro vzorky 1–30, 36–45

Sada vzorků 1 (1–30, 36–45)			
Název alkanu	Počet uhlíků	Retenční časy MS (min.)	Retenční indexy
<i>n</i> -oktan	8	6,855	800
<i>n</i> -nonan	9	10,12	900
<i>n</i> -dekan	10	13,517	1000
<i>n</i> -undekan	11	16,784	1100
<i>n</i> -dodekan	12	19,858	1200
<i>n</i> -tridekan	13	22,741	1300
<i>n</i> -tetradekan	14	25,451	1400
<i>n</i> -pentadekan	15	28,005	1500
<i>n</i> -hexadekan	16	30,419	1600
<i>n</i> -heptadekan	17	32,707	1700
<i>n</i> -oktadekan	18	34,879	1800
<i>n</i> -nonadekan	19	37,2	1900
<i>n</i> -ikosan	20	40,194	2000

Tabulka 16: Retenční časy *n*-alkanů z dat GC-MS s retenčními indexy pro vzorky 31–35, 46–50

Sada vzorků 2 (31–35, 46–50)			
Název alkanu	Počet uhlíků	Retenční časy MS (min.)	Retenční indexy
<i>n</i> -oktan	8	6,82	800
<i>n</i> -nonan	9	10,083	900
<i>n</i> -dekan	10	13,483	1000
<i>n</i> -undekan	11	16,75	1100
<i>n</i> -dodekan	12	19,824	1200
<i>n</i> -tridekan	13	22,709	1300
<i>n</i> -tetradekan	14	25,419	1400
<i>n</i> -pentadekan	15	27,974	1500
<i>n</i> -hexadekan	16	30,39	1600
<i>n</i> -heptadekan	17	32,677	1700
<i>n</i> -oktadekan	18	34,849	1800
<i>n</i> -nonadekan	19	37,167	1900
<i>n</i> -ikosan	20	40,144	2000

Tabulka 17: Retenční časy *n*-alkanů z dat GC-MS s retenčními indexy pro vzorky 51–60

Sada vzorků 3 (51–60)			
Název alkanu	Počet uhlíků	Retenční časy MS (min.)	Retenční indexy
<i>n</i> -oktan	8	6,875	800
<i>n</i> -nonan	9	10,144	900
<i>n</i> -dekan	10	13,544	1000
<i>n</i> -undekan	11	16,811	1100
<i>n</i> -dodekan	12	19,885	1200
<i>n</i> -tridekan	13	22,768	1300
<i>n</i> -tetradekan	14	25,478	1400
<i>n</i> -pentadekan	15	28,033	1500
<i>n</i> -hexadekan	16	30,446	1600
<i>n</i> -heptadekan	17	32,736	1700
<i>n</i> -oktadekan	18	34,908	1800
<i>n</i> -nonadekan	19	37,239	1900
<i>n</i> -ikosan	20	40,243	2000

Tabulka 18: Retenční časy *n*-alkanů z dat GC-MS s retenčními indexy pro vzorky 61 - 78

Sada vzorků 4 (61–78)			
Název alkanu	Počet uhlíků	Retenční časy MS (min)	Retenční indexy
<i>n</i> -oktan	8	6,833	800
<i>n</i> -nonan	9	10,094	900
<i>n</i> -dekan	10	13,492	1000
<i>n</i> -undekan	11	16,757	1100
<i>n</i> -dodekan	12	19,831	1200
<i>n</i> -tridekan	13	22,715	1300
<i>n</i> -tetradekan	14	25,425	1400
<i>n</i> -pentadekan	15	27,982	1500
<i>n</i> -hexadekan	16	30,396	1600
<i>n</i> -heptadekan	17	32,762	1700
<i>n</i> -oktadekan	18	34,856	1800
<i>n</i> -nonadekan	19	37,172	1900
<i>n</i> -ikosan	20	40,155	2000

Tabulka 19: Tabulka identifikovaných těkavých látek z obou druhů vín metodou GC-MS

Retenční index	Sloučenina	CAS
RI0766	Ethyl isobutyřát	97 - 62 - 1
RI0777	β-Methylpropyl ethanoát	110-19-0
RI0790	2,3-Butandiol	513 - 85 - 9
RI0878	2-Methybutyl acetát	624 - 41 - 9
RI0899	-	-
RI0966	Ethyl 2-hydroxyisovalerát	2441 - 06 - 7
RI0969	Geranic oxid	7392 - 19 - 0
RI0974	1-Heptanol	111 - 70 - 6
RI1012	Hexyl acetát	142 - 92 - 7
RI1018	-	-
RI1031	Limonen	138 - 86 - 3
RI1036	β-Ocimen	3779 - 61 - 1
RI1057	Ethyl 2-hydroxyhexanoát	6946 - 90 - 3
RI1068	Isoamyl laktát	168920 - 35 - 2
RI1071	cis-Linalool oxid	5989 - 33 - 3
RI1089	trans-Linalool oxid	34995 - 77 - 2
RI1096	Ethyl heptanoát	106 - 30 - 9
RI1115	Phenylethyl alkohol	60 - 12 - 8
RI1167	Ethylfenol	123 - 07 - 9
RI1195	Ethyl kaprylát	106 - 32 - 1
RI1249	Isoamyl caproát	2198 - 61 - 0
RI1257	β-Phenethyl acetát	103 - 45 - 7
RI1263	Diethyl malát	7554 - 12 - 3
RI1278	p-Ethylguaiacol	2785 - 89 - 9
RI1282	Geranyl ethyl ether	40267-72-9
RI1286	-	-
RI1287	-	-
RI1290	Propyl octanoát	624 - 13 - 5
RI1292	cis-Wiskey lacton	39212 - 23 - 2
RI1315	Vinylguajacol	7786 - 61 - 0
RI1325	trans-Wiskey lacton	39212 - 23 - 2
RI1366	TDN izomer	30364-38-6
RI1385	Ethyl 9-decenoát	67233 - 91 - 4
RI1426	Ethyl isopentyl succinát	28024 - 16 - 0

K - konvenční vína

N - naturální vína

4 ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce byla zpracována literární rešerše zpracovávající téma výroby vína v jednotlivých technologických krocích, počínaje sklizní hroznů, předfermentační úpravě moštu, alkoholové fermentaci, školení a zrání vína. Byly popsány rozdíly mezi konvenční výrobou vín, biovín a naturálních vín. V další kapitole bylo řešeno chemické složení vína a uvedeny jednotlivé skupiny sloučenin, které jsou přítomné ve vínech. Následuje kapitola zaměřená na extrakci těkavých organických látek vína a popsány jednotlivé techniky extrakcí s navazující kapitolou stanovení těkavých organických látek metodou plynové chromatografie s plameno-ionizační a hmotnostní detekcí ve spojení s headspace vzorkováním. V poslední části teoretické části je popsáno statistické vyhodnocení chromatografických dat.

Experimentální část práce popisuje vývoj analytické metody pro stanovení aroma profilu vína. Cílem práce bylo vyvinout metodu pro změření „otisku prstu“ vonných látek vzorku vína a s pomocí statistického modelu predikovat, zda je víno vyrobeno konvenčními nebo naturálními technologickými postupy.

Na shromážděném souboru 78 bílých vín byla provedena experimentální část práce. Ze souboru bylo 49 vín konvenční výroby a 29 naturálních vín. Byl vypracován postup extrakce a následné analýzy metodami HS-SPME/GC-FID a HS-SPME/GC-MS. Z naměřených chromatografických dat byly vyhodnoceny retenční časy a plochy jednotlivých sloučenin, ke kterým byl dopočítán retenční index. Takto zpracovaná chromatografická data byla následně vyhodnocena statistickým softwarem metodou OPLS. Funkčnost modelu byla otestována validací predikce neznámou sadou vzorků se zjištěnou 100 % spolehlivostí a s korelačním koeficientem předpovědi 0,9188. Metodiku je možné použít pro rozlišení konvenčních a naturálních bílých vín.

Dále byla provedena identifikace látek, které mají významný příspěvek pro predikci rozdělení vína mezi konvenční nebo naturální statistickou OPLS metodou. Identifikace byla založena na porovnání naměřených spekter s knihovnou NIST společně s porovnáním retenčního indexu sloučeniny.

V diplomové práci byla vyvinuta metodika stanovení otisku prstu aroma profilu vína a jeho následným statistickým vyhodnocením metodou OPLS pro zatřídění vína mezi konvenční nebo naturální.

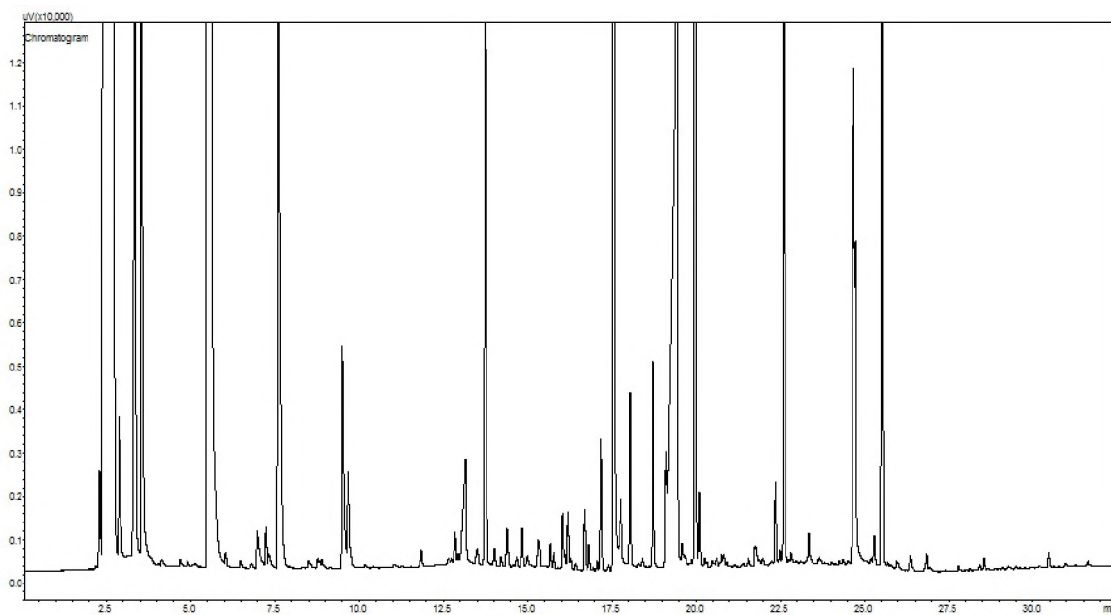
POUŽITÁ LITERATURA

1. Organisation, I.O.o.V.a.W.I., *2019 Statistical Report on World Vitiviniculture*. 2019, International Organisation of Vine and Wine Intergovernmental Organisation.
2. Bublíková, L., *Situační a výhledová zpráva Réva vinná a víno*. 2019, Ministerstvo zemědělství ČR.
3. Soleas, G.J., E.P. Diamandis, and D.M. Goldberg, *Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention*. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 1997. **11**(5): p. 287-313.
4. Vilém, K., *Encyklopedie českého a moravského vína 1*. 2005: Praga Mystica.
5. Mazálková, P., *Bakalářská práce*. 2013, Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
6. Josef Balík, J.S., *Vinařská Technologie*. 2017, Valtice: Národní vinařské centrum, o.p.s.
7. Kraus, V., Z. Foffová, and B. Vurm, *Encyklopedie českého a moravského vína 2.díl*. 2008: Praga Mystica.
8. Kraus, V., H. V., and A. P., *Rukověť vinaře*. 2000: Květ.
9. Fic, V. and a. kolektiv, *Víno*. 2015: 2 Theta.
10. Michlovský, M., *Lexikon chemického složení vína*. 2014, Rakvice: Vinselekt Michlovský a.s.
11. Michlovský, M., *Příprava bílých vín*. 2014: Vinselekt Michlovský.
12. Kostihová, L., *Diplomová práce*. 2019: Mendelova univerzita v Brně.
13. Vontrobova, E., et al., *Autochthonous yeasts as one of the tools to produce wines by original technologies*. Kvasny Prumysl, 2019. **65**(1): p. 38-45.
14. Furdikova, K., et al., *Influence of different nutrition conditions on main volatiles of wine yeasts*. Journal of Food and Nutrition Research, 2014. **53**(4): p. 304-312.
15. Fráňová, A., *Diplomová práce*. 2019: Mendelova univerzita v Brně.
16. Bely, M., et al., *Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation*. International Journal of Food Microbiology, 2008. **122**(3): p. 312-320.
17. Michlovský, M., *Příprava červených vín*. 2015: Vinselekt Michlovský, a.s.
18. Tomková, Š., *Diplomová práce*. 2011: Mendelova univerzita v Brně.
19. Cravero, M.C., *Organic and biodynamic wines quality and characteristics: A review*. Food Chemistry, 2019. **295**: p. 334-340.
20. Nestarcová, L., *Bakalářská práce*. 2019, Mendelova univerzita v Brně.
21. Franta, T., *Diplomová práce*. 2017: Mendelova univerzita v Brně.
22. Noguerol-Pato, R., et al., *Quantitative determination and characterisation of the main odourants of Mencia monovarietal red wines*. Food Chemistry, 2009. **117**(3): p. 473-484.
23. Perestrelo, R., J.M.F. Nogueira, and J.S. Camara, *Potentialities of two solventless extraction approaches-Stir bar sorptive extraction and headspace solid-phase microextraction for determination of higher alcohol acetates, isoamyl esters and ethyl esters in wines*. Talanta, 2009. **80**(2): p. 622-630.
24. Velíšek, J., *Chemie potravin 2*. 2002: OSSIS.
25. Furdikova, K., K. Makysova, and I. Spanik, *Effect of Indigenous *S. cerevisiae* Strains on Higher Alcohols, Volatile Acids, and Esters in Wine*. Czech Journal of Food Sciences, 2017. **35**(2): p. 131-142.
26. Velíšek, J., *Chemie potravin 1*. 2002: OSSIS.
27. Fic, V.a.k., *Vino - Sbornik aplikačních postupů*. 2014: 2 Theta.

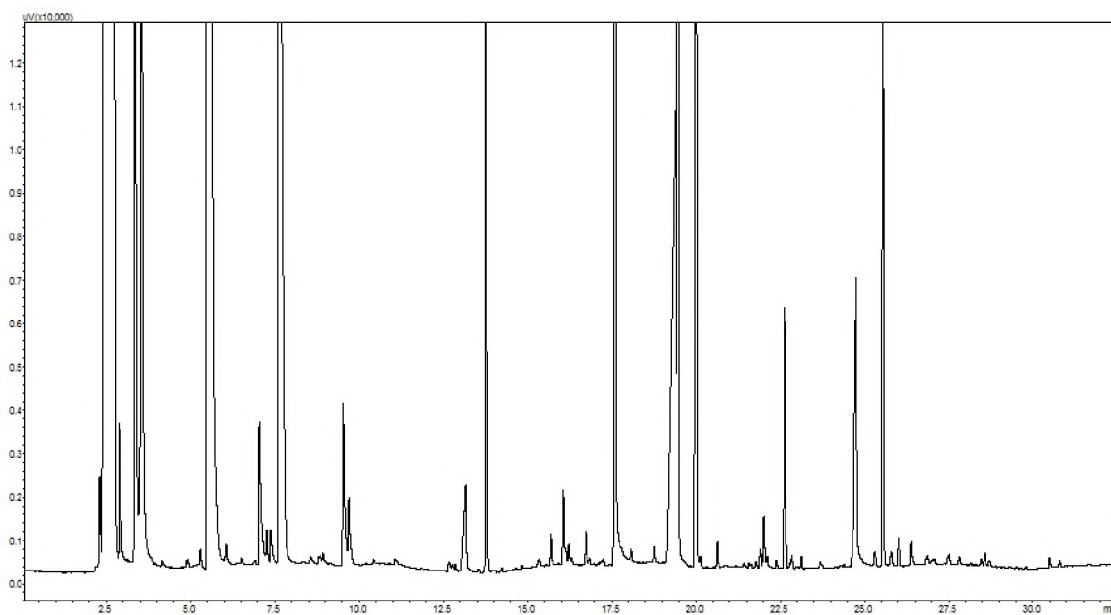
28. Velišek, J., *Chemie potravin* 3. 2002: Ossis.
29. Lampir, L. and P. Pavloušek, *Influence of Locality on Content of Phenolic Compounds in White Wines*. Czech Journal of Food Sciences, 2013. **31**(6): p. 619-626.
30. Perestrelo, R., et al., *Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds*. Analytica Chimica Acta, 2006. **563**(1-2): p. 154-164.
31. Bezerra, M.A., et al., *Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry*. Talanta, 2008. **76**(5): p. 965-977.
32. Arthur, C.L. and J. Pawliszyn, *SOLID-PHASE MICROEXTRACTION WITH THERMAL-DESORPTION USING FUSED-SILICA OPTICAL FIBERS*. Analytical Chemistry, 1990. **62**(19): p. 2145-2148.
33. Azzi-Achkouty, S., et al., *Headspace solid-phase microextraction for wine volatile analysis*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017. **57**(10): p. 2009-2020.
34. Kataoka, H., H.L. Lord, and J. Pawliszyn, *Applications of solid-phase microextraction in food analysis*. Journal of Chromatography A, 2000. **880**(1-2): p. 35-62.
35. Vas, G. and K. Vekey, *Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis*. Journal of Mass Spectrometry, 2004. **39**(3): p. 233-254.
36. Piri-Moghadam, H., M.N. Alam, and J. Pawliszyn, *Review of geometries and coating materials in solid phase microextraction: Opportunities, limitations, and future perspectives*. Analytica Chimica Acta, 2017. **984**: p. 42-65.
37. Jelen, H.H., et al., *Volatile compounds responsible for aroma of Jutrzenka liqueur wine*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(42): p. 7566-7573.
38. Rebiere, L., et al., *A robust method for quantification of volatile compounds within and between vintages using headspace-solid-phase micro-extraction coupled with GC-MS - Application on Semillon wines*. Analytica Chimica Acta, 2010. **660**(1-2): p. 149-157.
39. Weldegergis, B.T., et al., *Characterisation of volatile components of Pinotage wines using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (GC x GC-TOFMS)*. Food Chemistry, 2011. **129**(1): p. 188-199.
40. Robinson, A.L., et al., *Interactions between Wine Volatile Compounds and Grape and Wine Matrix Components Influence Aroma Compound Headspace Partitioning*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(21): p. 10313-10322.
41. Antalick, G., M.C. Perello, and G. de Revel, *Development, validation and application of a specific method for the quantitative determination of wine esters by headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry*. Food Chemistry, 2010. **121**(4): p. 1236-1245.
42. Prouteau, C., et al., *Improving headspace-solid-phase microextraction of 3-isobutyl-2-methoxy-pyrazine by experimental design with regard to stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometric analysis of wine*. Analytica Chimica Acta, 2004. **513**(1): p. 223-227.
43. Lord, H. and J. Pawliszyn, *Evolution of solid-phase microextraction technology*. Journal of Chromatography A, 2000. **885**(1-2): p. 153-193.
44. Zhou, Q., Y.P. Qian, and M.C. Qian, *Analysis of volatile phenols in alcoholic beverage by ethylene glycol-polydimethylsiloxane based stir bar sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2015. **1390**: p. 22-27.
45. Delgado, R., et al., *Development of a stir bar sorptive extraction method coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of volatile compounds in Sherry brandy*. Analytica Chimica Acta, 2010. **672**(1-2): p. 130-136.

46. Krejčíková, K., *Diplomová práce*. 2019, Pardubice: Univerzita Pardubice.
47. Ettre, L.S., *The Evolution of Gas Chromatographic Instrumentation at PerkinElmer*. 2005, PerkinElmer Life and Analytical Science: Shelton, CT USA. p. 16.
48. Kim, H.M., et al., *Simultaneous Determination of Volatile Organic Compounds in Commercial Alcoholic Beverages by Gas Chromatography with Flame Ionization Detection*. *Journal of Aoac International*, 2017. **100**(5): p. 1492-1499.
49. Kolb, B. and S.L. Etter, *Static Headspace-Gas Chromatography*. Second Edition ed. 2006, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
50. Yang, X.G. and T. Peppard, *SOLID-PHASE MICROEXTRACTION FOR FLAVOR ANALYSIS*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994. **42**(9): p. 1925-1930.
51. Snow, N.H. and G.C. Slack, *Head-space analysis in modern gas chromatography*. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2002. **21**(9-10): p. 608-617.
52. Perestrelo, R., et al., *Optimisation of solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry based methodology to establish the global volatile signature in pulp and skin of Vitis vinifera L. grape varieties*. *Talanta*, 2011. **85**(3): p. 1483-1493.
53. Bajer, T., et al., *Chemical profiling of volatile compounds of various home-made fruit spirits using headspace solid-phase microextraction*. *Journal of the Institute of Brewing*, 2017. **123**(1): p. 105-112.
54. van Ruth, S.M., *Methods for gas chromatography-olfactometry: a review*. *Biomolecular Engineering*, 2001. **17**(4-5): p. 121-128.
55. PerkinElmer, *GC SNFR Olfactory Port*, I. PerkinElmer, Editor. 2014.
56. Villiere, A., et al., *InnOscent system: Advancing flavor analysis using an original gas chromatographic analytical device*. *Journal of Chromatography A*, 2018. **1535**: p. 129-140.
57. Bajer, T., et al., *Volatile compounds fingerprinting of larch tree samples for Siberian and European larch distinction*. *European Journal of Wood and Wood Products*, 2020. **78**(2): p. 393-402.
58. Trygg, J. and S. Wold, *Orthogonal projections to latent structures (O-PLS)*. *Journal of Chemometrics*, 2002. **16**(3): p. 119-128.
59. Kraus, V., et al., *Encyklopedie českého a moravského vína 1.díl*. 2005: Praga Mystica.
60. Linstrom, P.J. and W. Mallard. *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69*. Dostupné online: <https://webbook.nist.gov/chemistry/> (poslední přístup 18.června 2020).

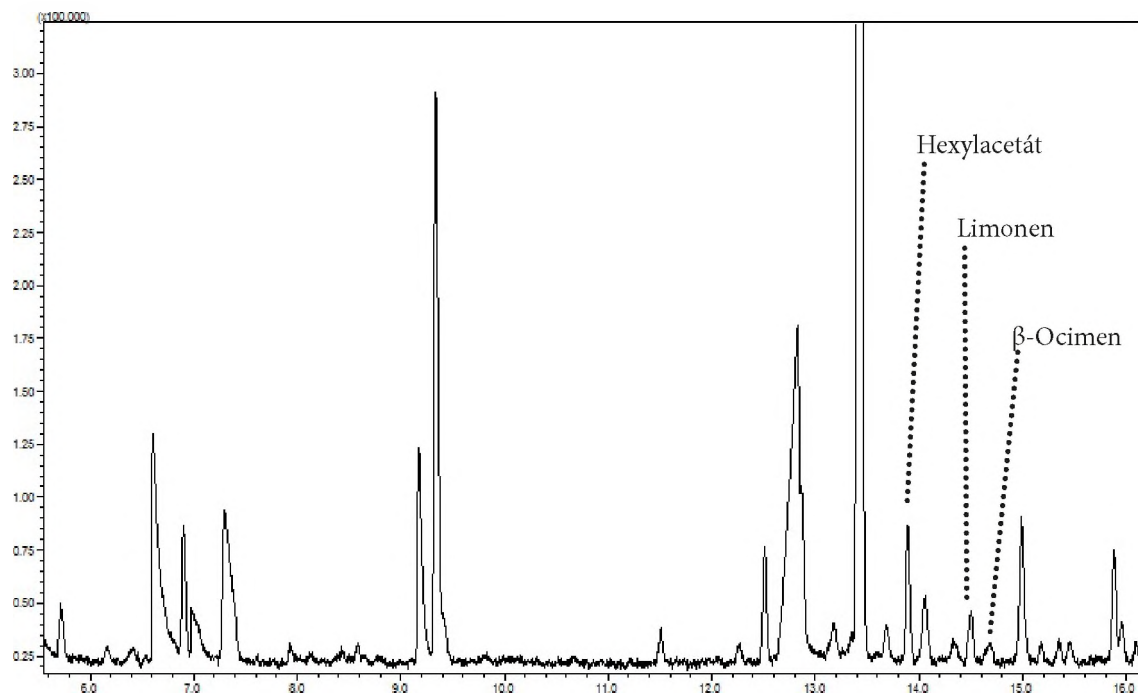
PŘÍLOHY



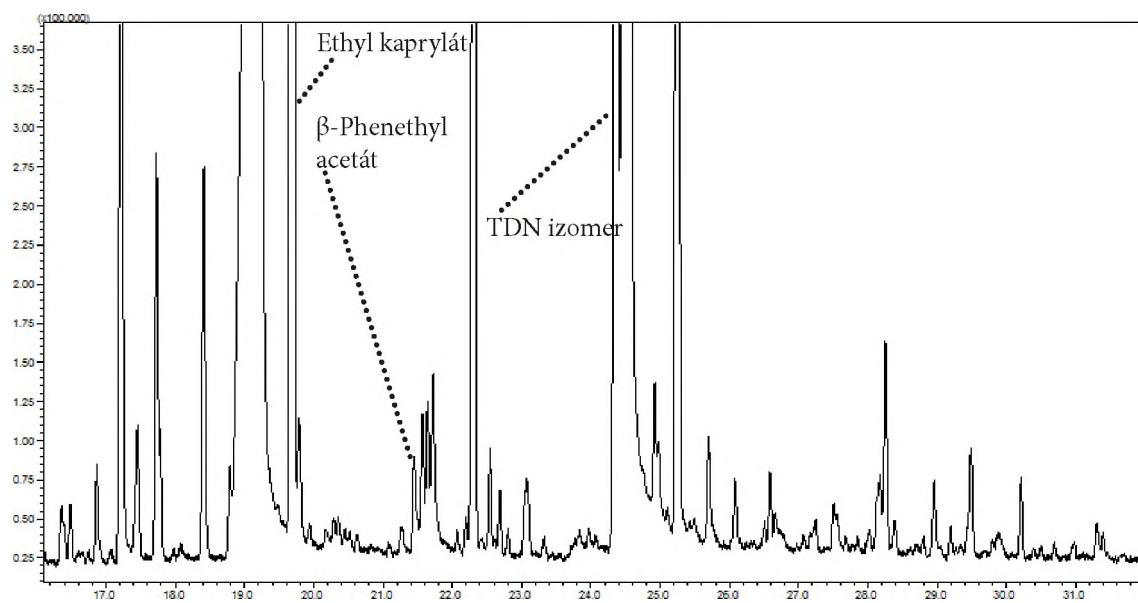
Příloha 1: Chromatogram konvenčního vína VZ34A naměřený metodou GC-FID



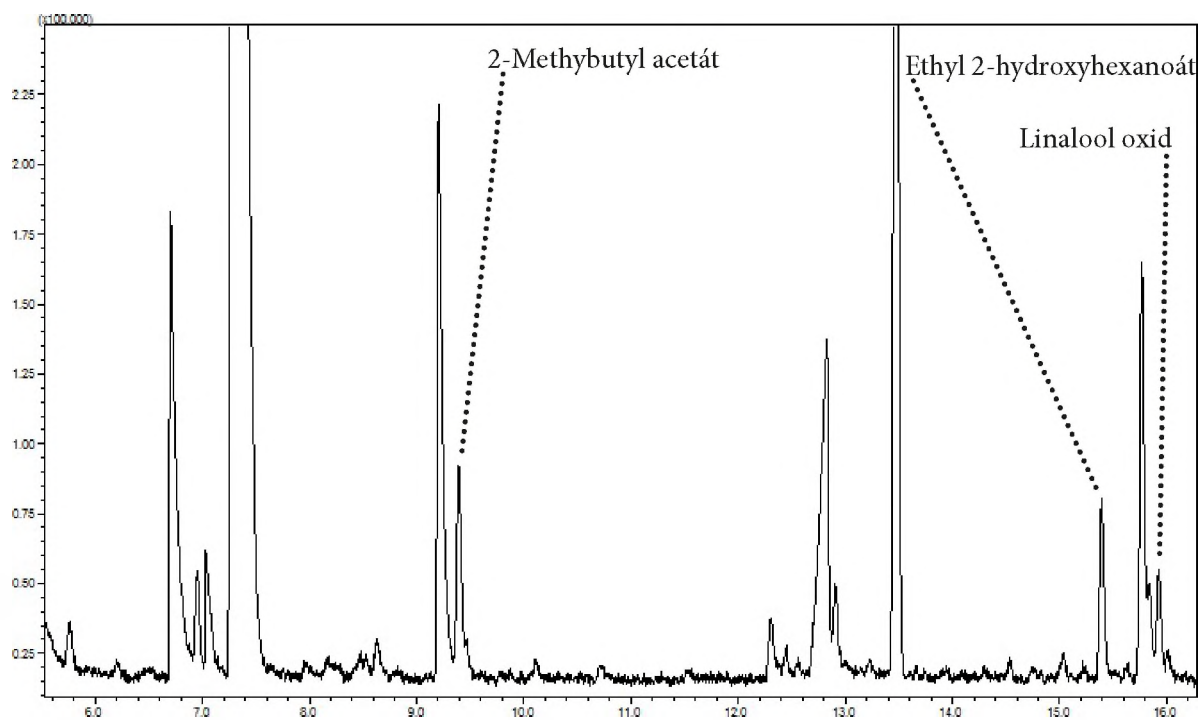
Příloha 2: Chromatogram přírodního vína VZ50A naměřený metodou GC-FID



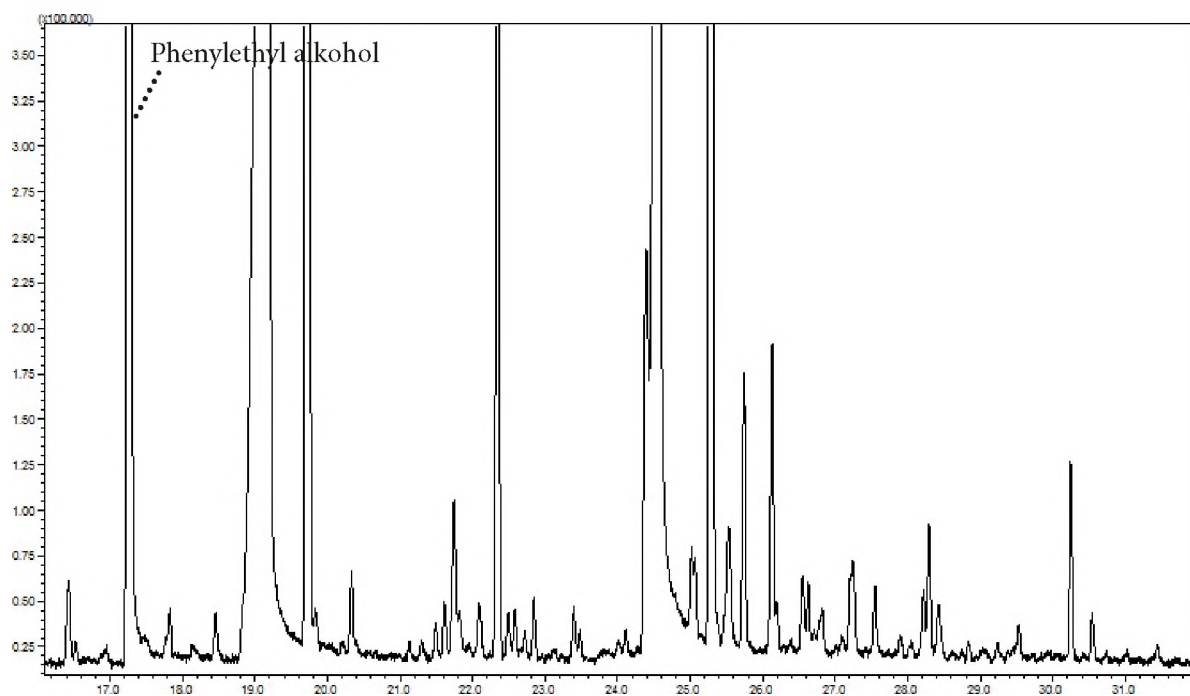
Příloha 3: Chromatogram konvenčního vína VZ34 naměřený metodou GC-MS (5,5–16 min.)



Příloha 4: Chromatogram konvenčního vína VZ34 naměřený metodou GC-MS (16–32 min.)



Příloha 5: Chromatogram přírodního vína VZ50 naměřený metodou GC-MS (5,5–16,0 min.)



Příloha 6: Chromatogram přírodního vína VZ50 naměřený metodou GC-MS (16,0–32 min.)