



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## BARVIVA ČERVENÝCH A BÍLÝCH ODRŮD VÍNA

DYES OF RED AND WHITE WINE CULTIVARS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

TEREZA PEPRNÁ

VEDOUcí PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. MILENA VESPALCOVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0363/2008** Akademický rok: **2008/2009**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Tereza Peprná**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)  
Studijní obor: Potravinářská chemie (2901R021)  
Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.**  
Konzultanti bakalářské práce:

### Název bakalářské práce:

Barviva červených a bílých odrůd vína

### Zadání bakalářské práce:

Teoretická část:

- 1) Popis a vlastnosti barviv obsažených v červeném a v bílém víně
- 2) Popis procesu lyofilizace

Experimentální část:

- 1) Příprava rostlinného materiálu pro extrakci barviv
- 2) Lyofilizace rostlinného materiálu

### Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Tereza Peprná  
Student(ka)

-----  
RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

-----  
doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Teoretická část bakalářské práce shrnuje informace o barvivech obsažených v červených a bílých odrudách hroznů. V úvodu je popsáno složení jednotlivých částí plodu hroznů. Největší pozornost je věnována barvivům červených odrud vína. Je popsána jejich obecná charakteristika, stabilita jejich chování v průběhu výroby a skladování vína. Součástí práce je i krátká rešerše metod jejich stanovení. Dále jsou charakterizována barviva bílých kultivarů. V další kapitole je popsán proces postupu sublimačního sušení neboli lyofilizace. Tato metoda byla použita v experimentální části bakalářské práce při zpracování vzorků hroznů. Hrozny byly ihned po odtržení zmrazeny na suchém ledu. V dusíkové atmosféře byly odděleny slupky od dužniny a poté byly slupky lyofilizovány.

## **ABSTRACT**

Theoretical part of this bachelor thesis contains informations about dyes of red and white grape species. At the beginning there is described component composition of grape berry. The biggest attention was paid to colour of red wine species. It deals with their common characterization, stabilization of their behaviour during production and storage wine. This work includes short recherche of their determination methods. Than there are mentioned colour of white wine cultivars. In another chapter there are described process of freeze drying otherwise lyophilization procedure. This method was used in experimental part while grape sample manufacturing. Grapes were immediately frozed on the dry ice after their separation. Skins were separated from pulp in nitrogen atmosphere and than these skins were lyophilized.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

*Vitis vinifera*, anthokyany, chlorofyly, žlutá barviva, lyofilizace

## **KEYWORDS**

*Vitis vinifera*, anthocyanins, chlorophyls, yellow pigments, freeze-drying

PEPRNÁ, T. *Barviva červených a bílých odrůd vína*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 38 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
Podpis studenta

*Poděkování:*

*Chtěla bych poděkovat vedoucí této bakalářské práce RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D. a Ing. Lence Šťavíkové za poskytnutí rad v průběhu řešení bakalářské práce.*

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
2.1	VÝVIN HROZNŮ VINNÉ RÉVY A JEJÍ SLOŽENÍ.....	8
2.1.1	<i>Vznik a zrání bobulí</i> .....	8
2.1.2	<i>Chemické složení hroznu</i> .....	8
2.2	BARVIVA ČERVENÝCH ODRŮD VÍN.....	10
2.2.1	<i>Charakteristika anthokyanů</i> .....	10
2.2.2	<i>Stabilita</i> .....	11
2.2.2.1	Vliv pH.....	11
2.2.2.2	Teplota, světlo .....	12
2.2.2.3	Oxid siřičitý.....	12
2.2.2.4	Polyfenoloxidázy.....	13
2.2.2.5	Kopigmentace a polymerace .....	13
2.2.2.6	Antioxidační aktivita a vliv na člověka .....	16
2.2.3	<i>Chování anthokyanů v průběhu výroby a skladování vína</i> .....	16
2.2.3.1	Výroba vína.....	16
2.2.3.2	Skladování a stárnutí vína .....	17
2.2.4	<i>Zisk antokyanů</i> .....	17
2.2.5	<i>Purifikační metody</i> .....	18
2.2.6	<i>Metody stanovení anthokyanů</i> .....	19
2.2.6.1	Jednoduché spektrální metody.....	19
2.2.6.2	Kapilární elektroforéza.....	19
2.2.6.3	Historické chromatografické metody .....	19
2.2.6.4	Vysoko-účinná kapalinová chromatografie.....	20
2.2.7	<i>Příprava vzorků</i> .....	22
2.3	BARVIVA BÍLÝCH ODRŮD VÍNA .....	22
2.3.1	<i>Reakce vedoucích k tvorbě žlutých pigmentů</i> .....	23
2.3.2	<i>Procesy hnědnutí</i> .....	25
2.4	POPIS PROCESU LYOFILIZACE.....	26
2.4.1	<i>Základní popis procesu</i> .....	26
2.4.1.1	Zmrazení rostlinného materiálu.....	26
2.4.1.2	Způsoby dodání tepla .....	27
2.4.1.3	Primární sušení.....	27
2.4.1.4	Sekundární sušení.....	27
2.4.2	<i>Rychlost sublimačního sušení</i> .....	27
2.4.3	<i>Lyofilizační zařízení</i> .....	28
2.4.4	<i>Aplikace</i> .....	30
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>32</b>
3.1	PŘÍPRAVA ROSTLINNÉHO MATERIÁLU PRO EXTRAKCI BARVIV .....	32
3.1.1	<i>Modrý Portugal</i> .....	32
3.1.2	<i>Rulandské šedé</i> .....	33
3.2	ZPRACOVÁNÍ HROZNŮ A JEJICH LYOFILIZACE .....	33
<b>4</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>34</b>

5	POUŽITÁ LITERATURA .....	35
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	38

# 1 ÚVOD

Vinná réva je celosvětově nejpěstovanějším ovocem. Přibližně 80 % z celkové úrody se spotřebuje na výrobu vína, 13 % je prodáváno spotřebiteli na přímý konzum a zbylá část se využívá na výrobu džusů, rozinek apod. Jsou dva hlavní typy hroznů: Evropské a Severoamerické. Asi 95 % Evropských vín patří do třídy *Vitis vinifera* L. Tento druh hroznů je charakterizován relativně tenkou slupkou, která přilíná na jemnou dužinu. Nejvyšší vinná réva roste ve středně proměnlivém klimatu s dlouhými, suchými léty a mírnými zimami. Za přední druhy vín považujeme Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Pinot Noir, Carignane. Spotřebitelské hrozny mají velké, chutné bobule atraktivní barvy. Zde jsou hlavními zástupci druhy Emperor a Tokay.

Bobule hroznů jsou složeny ze slupky, dužiny a semen. Slupka bývá různě zbarvená. U bílých odrůd se objevuje zbarvení zelené, žlutozelené a jantarové, červené odrůdy mají slupku červenou až červenofialovou. Sytost zbarvení bobulí se liší s jednotlivými odrůdami a je podmíněna stupněm zralosti hroznů. Dužina bývá u většiny odrůd bezbarvá. Výjimkou jsou tzv. barvíčky, které obsahují červená barviva i v jejich dužině. Semena obsahují zejména oleje a třísloviny. Je důležité, aby nebyla při lisování rozdracena, protože jsou zodpovědná za hořkou příchut' vína. Třísloviny působí příznivě při výrobě červeného vína na rozpuštění a ustálení červeného barviva.

Barviva se řadí do cizorodých látek přídatných. Tyto látky se přidávají do potravin úmyslně pro zlepšení jejich kvality, avšak nesmí sloužit k maskování použití nevhodné suroviny nebo nehygienických metod. Barviva se přidávají do potravin z několika důvodů, např. k tomu, aby potravině udělily barvu, kterou by bez jejich použití neměla, ke znovuzískání barevného vzhledu potraviny, který se během zpracovatelských procesů změnil a také ke zvýšení spotřebitelské atraktivnosti výrobku. K barvení se používají jak barviva přírodního původu, nejčastěji rostlinného, tak barviva syntetická, která se získávají při zpracování ropy a dehtu. Mezi nejvýznamnější rostlinná barviva patří flavonoidy, karotenoidy, antrachinony, betalainy a pyrrolová barviva. V České Republice upravuje vyhláška 304/2004 Sb. použití přídatných látek, jejich nejvyšší přípustné množství a povinnost značení na obalu.

Již od nejranějších dob člověk usilovně hledal metody ochrany vzácných potravin a přírodních produktů před rozkladem. Jednou ze současně úspěšných metod je zmrazení a uskladnění daného materiálu. Vyskytují se zde ale závažné praktické nevýhody, jmenovitě to jsou: vysoká cena na udržení stále zmrzlých materiálů a možné porušení zmrzlého produktu a následně jeho ztráta. Tyto nedostatky podnítily osvojení sušících metod. Tradiční sušící techniky používají vysoké teploty. Dochází k úspěšné dehydrataci materiálu, což má ale za následek změnu v organoleptických vlastnostech, snížení nutriční hodnoty nebo snížení biologické aktivity v případě enzymů a hormonů. Sublimační sušení je výbornou alternativní technikou používanou pro uchování nestabilních materiálů. Rozvoj metody nastal v 30. letech 20. století.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Vývin hroznů vinné révy a její složení

#### 2.1.1 Vznik a zrání bobulí

Vývin hroznů vinné révy začíná po oplození květu. Pokračuje vznikem pupenů, třapin přes kvetení až k růstu a zrání bobulí. Třapina může mít několik podob, podle kterých se formuje tvar celého hroznu. Nejčastěji jsou to tvary cylindrické, kónické, rozvětvené nebo nepravidelné [1].

V růstové fázi, 15–30 dní od odkvetení dochází k nárůstu počtu buněk. Jakmile se jejich počet ustálí, počne zvětšovat jejich velikost, objem a hmotnost bobulí. Z vnějších buněk vzniká slupka. Vnitřních buňky rostou radiálně směrem k povrchu. Buňky s jemnou buněčnou membránou tvoří dužinu. V období růstu bobulí dochází k intenzivním fyziologickým procesům jako jsou asimilace, dýchání a transpirace. V zelených bobulích vzniká malé množství cukru, zejména glukosy a fruktosy. Téměř polovina cukrů se prodýchá. Tato produkce cukrů tvoří asi pouze 1/5 potřeby pro samotný růst bobulí, zbylá část se tedy do bobulí dostává z listů soustavou vodivých pletiv [1].

V první fázi zrání bobulí je přísun cukrů z listů vyšší než buňky spotřebují v rámci jejich metabolismu. Nastávají kvantitativní a kvalitativní změny komponent buněčné šťávy bobulí a ostatních částí hroznu. Slupka se ztenčuje, stává se elastickou, snižuje se koncentrace zelených listových pigmentů. Na povrchu bobulí se vytváří voskový povlak specifický pro jednotlivé kultivary. Začíná hromadění buketních látek. Červené odrůdy hroznů kumulují červená barviva a třísloviny v horních pletivech slupky. U bílých odrůd se mění barva ze zelené na zelenožlutou nebo zlatožlutou. Zrání bobulí závisí na poloze stanoviště, podnebí, pěstitelských a klimatických podmínkách [1].

Během přezrávání hroznů dochází k odpařování vody, čímž se koncentruje obsah cukrů a ostatních látek, které tvoří extrakt. Přísun asimilátu je omezený. Bobulky se smršťují neboli hrozinkovají. V důsledku lokálních biochemických přeměn se snižuje obsah kyselin, dusíkatých látek a rostlinných polyfenolů [1].

Ve většině našich vinohradnických oblastí způsobují hnití hroznů plísně *Botrytis Cinerea* a plísně rodu *Penicillium*. Za nepříznivého počasí proniká plíseň *Botrytis Cinerea* přes slupku zdravých nebo poškozených bobulí do dužiny, využívá jako zdroj energie převážně organické kyseliny, dusíkaté látky a poměrně málo sacharidů. Způsobuje předčasné měknutí a hnití bobulí. Plíseň svým enzymovým systémem degraduje anthokyanová barviva, flavanoly třísloviny aj. Obsah barviv se snižuje až o 75 %, obsah tříslovin o 86 %. Rod *Penicillium* způsobuje tzv. zelenou hnilobu hroznu, jeho přítomností se mění konzistence dužiny na kašovitou zapáchající hmotu. Zdrojem energie tohoto rodu plísní jsou především sacharidy, potom přicházejí na řadu kyseliny, třísloviny, anthokyanové barviva a dusíkaté látky [1].

#### 2.1.2 Chemické složení hroznu

Na chemickém složení hroznů závisí technologie výroby vín. Cílem je vyrobit dezertní, šumivá vína a vinné destiláty s maximální kvalitou. Hrozen se skládá z třapiny a bobulí. Přičemž nejdůležitějšími částmi hroznu jsou bobule. Jednotlivé složky hroznu se liší jednak z hlediska morfologického, tak hmotnostního. Jsou rozdílné v závislosti na jednotlivých

odrůdách, geologických a pěstitelských faktorech, případně na výskytu chorob a působení škůdců. Jednotlivé části hroznu mají vliv na kvalitu výsledného vína a na jeho chemické složení. Hmotnostní struktura hroznu se pohybuje v tomto rozpětí: třápiny 2–5 %, bobule 95–98 % [1].

### ***Bobule***

Bobule vyrůstají ze stopek a skládají se ze slupky, dužiny a semen. Jednotlivá hmotnostní zastoupení jsou: 7–11 % slupek, 2–6 % semen a 83–91 % dužiny. Hmotnost bobulí je rozdílná a pohybuje se v rozmezí 100 bobulí = 115–400 g. Jejich velikost ovlivňuje typ kultivaru, výživa rostliny, hlavně dostatek vody v půdě. Tvar a barva bobulí jsou výrazně odrůdové vlastnosti. Stupeň zralosti reprezentuje barevný tón barviv [1].

### ***Slupka***

Slupka je tvořena asi 6–10 vrstvami buněk. Šířka slupky je u jednotlivých druhů rozdílná. Tato část bobule obsahuje značné množství přírodních látek, které mají vliv na kvalitu vína, zejména na jeho vůni. Největší zastoupení má voda (53–82 %). Buněčné šťávy slupky obsahují cukry, organické kyseliny, třísloviny, polyfenoly, oxalát vápenatý, listové pigmenty, flavony, minerální a dusíkaté látky. Membrána je tvořena převážně celulórou a voskovitými sloučeninami. Vytvářejí souvislý povlak, který chrání bobuli před působením vody, nežádoucích mikroorganismů a reguluje intenzitu dýchání. Voskovitá hmota je složena ze stearinu, palmitinu, laurinu, myristinu, pelarginu a cenantinu. Slupky bílých hroznů obsahují zelená a žlutá barviva, červené odrůdy obsahují velké množství polyfenolů, především anthokyanů. V našich geologických podmínkách trvá hromadění anthokyanů v subkutikulární vrstvě slupky asi 60–70 dní, v závislosti od počasí [1].

### ***Dužina***

Tato část bobule je základem pro vinařskou technologii. Přibližně 8 % hmotnosti dužiny tvoří cévní svazky, zbytek jsou buněčné a mezibuněčné šťávy. Dužinu můžeme rozdělit na dvě části: vnější část – šťavnatější a vnitřní část – tužší, jsou v ní uložena semena a cévní svazky, jimiž proudí vodné roztoky asimilátů do bobule. Ve šťávě dužiny se nacházejí všechny látky, které obsahuje vylisovaný hroznový mošt. Jejich složení závisí na odrůdě. Majoritními složkami jsou voda, cukry, volné a vázané organické kyseliny, minerální a dusíkaté látky. V menším množství se zde nacházejí třísloviny, barviva, vitamíny, enzymy, buketní látky a popel. Uvedené látky jsou pro víno velmi důležité i když jsou přítomny v malých koncentracích [1].

### ***Semena***

Bobule obsahuje 1–4 semen, jejichž sušina tvoří asi 71,5 % z hmotnosti semen. Významnou část sušiny tvoří olej. Jeho hlavními komponenty jsou glyceridy kyseliny stearové, palmitové a linolové. V menším množství obsahuje glyceridy kyseliny olejové, ricinové a linoleové. Další významnou částí sušiny jsou třísloviny. Semena červených odrůd obsahují více tříslovin než semena odrůd bílých. Hlavní součástí tříslovin jsou katechiny. Semena obsahují i leukoanthokyan. Tyto látky zvyšují kvalitu červených vín tím, že se mohou transformovat na anthokyan a třísloviny. Z cukrů v semenech najdeme glukosu, fruktosu a sacharosu. Jejich množství je rozdílné s jednotlivými odrůdami. Stejně tak se různí

obsah pektinů, protopektinů a solí kyseliny pektinové a tuků. Kdežto obsah minerálních látek je poměrně vyrovnaný [1].

### **Třapiny**

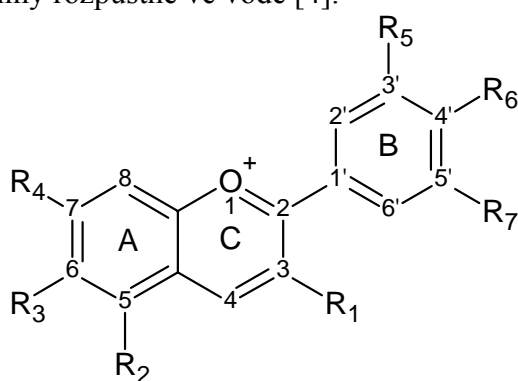
Třapiny jsou celky rozvětvených stopek hroznů. Zajišťují spojení mezi listy a bobulemi. Chemické složení třapin je v závislosti na odrůdě odlišné. Obsah vody, jako jejich hlavní složky závisí na stupni zralosti bobulí. Třapiny obsahují málo cukrů, kyseliny vinné a jablečné, o to více jsou v nich zastoupeny tříslovinou, dusíkaté a minerální látky. Dostatečně nevyzrálé třapiny obsahují velké množství zelených a žlutých barviv. Při lisování vysokým tlakem může nastat nežádoucí vytlačení zelených barviv do moštů, čímž se znehodnocuje jejich kvalita. Proto se před lisováním třapiny od hroznů oddělují a tomuto ději říkáme odzrňování [1].

## **2.2 Barviva červených odrůd vín**

Anthokyaniny (z řeckého slova *anthos* = květina, *kianos* = modrý) jsou nejdůležitější přírodní barviva cévnatých rostlin. Nalézají se ve vakuolách v povrchových částech ovoce a zeleniny, ve slupkách a v okrajových vrstvách dužiny. Najdeme je především v hroznech, bezinkách, červeném zelí a některých okrasných rostlinách. Jsou rozpustné ve vodě, mají výrazné antioxidační účinky, které hrají důležitou roli při prevenci kardiovaskulárních nemocí, rakovině a cukrovky. Jsou zodpovědné za červenou, modrou a fialovou barvu ovoce, zeleniny a dalších rostlin [3,4].

### **2.2.1 Charakteristika anthokyanů**

Anthokyaniny jsou polyfenolické sloučeniny, zvané též jako flavonoidy. Anthokyanidin neboli aglykon je základní jednotkou anthokyanů. Je složen z aromatického jádra [A] připojeného k heterocyklickému kruhu [C], který obsahuje kyslík a je navázán vazbou C-C na třetí aromatické jádro [B]. Na aglykon se glykosidickou vazbou váže jeden nebo více sacharidů, většinou na pozice C3, C5 nebo C7. Po navázání sacharidu se aglykonu říká anthokyan. Jsou to sloučeniny rozpustné ve vodě [4].



*Struktura aglykonu*

Jednotlivé struktury anthokyanů se od sebe liší (1) počtem a pozicí hydroxy- nebo methoxy- substituentů na aglykonové struktuře (2) počtem a pozicí sacharidových zbytků navázaných na anthokyanidin (3) acylací těchto skupin. V současnosti je známých 19 přirozeně se vyskytujících anthokyanů. V hroznech a vínech druhu *Vitis vinifera* L. se vyskytují pouze: malvidin, petunidin, peonidin, kyanidin a delfidin. Na aglykon se v pozici

3 váže O-glykosidickou vazbou cukr. Mezi nejčastěji se vyskytující sacharidy v anthokyanech patří glukosa, rhammosa, xylosa, galaktosa, arabinosa a fruktosa. Anthokyanany mohou být dále acetylovány kyselinou octovou, p-kumarovou, sukcinovou, šťavelovou, kávovou aj. Acetylované anthokyanany najdeme především v hroznech typu Cabernet Sauvignon. Pinot Noir obsahuje pouze neacetylované formy anthokyanů. Malvidin-3-glukosid zaujímá až 90 % všech anthokyanů ve vínech [5, 8, 9].

Tabulka 1. Substituenty navázané na aglykon jednotlivých antokyanů

Sloučenina	Zkratka	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
Kyanidin	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
Delfidin	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH
Malvidin	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe
Peonidin	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H
Petunidin	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH

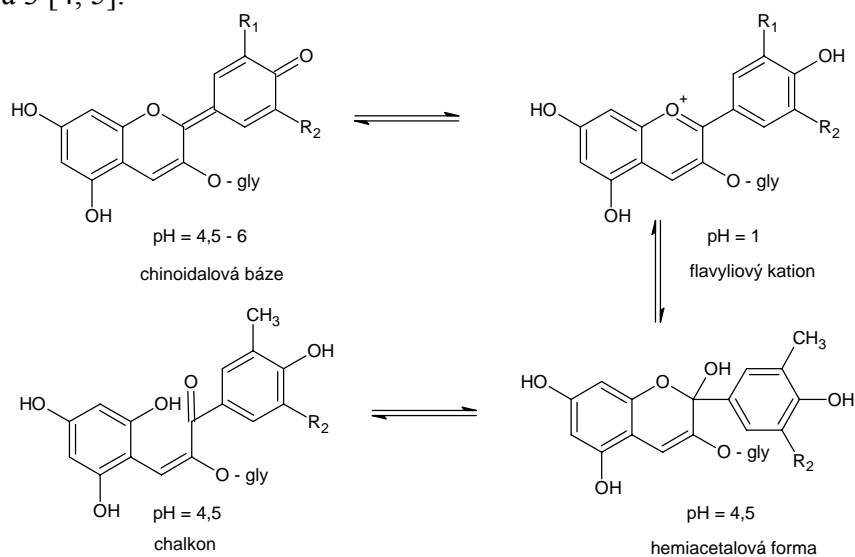
Hrozny jiného typu než *Vitis Vinifera* L. obsahují kromě monoglukosidů i 3,5-diglukosidické formy těchto pěti anthokyanů [3].

## 2.2.2 Stabilita

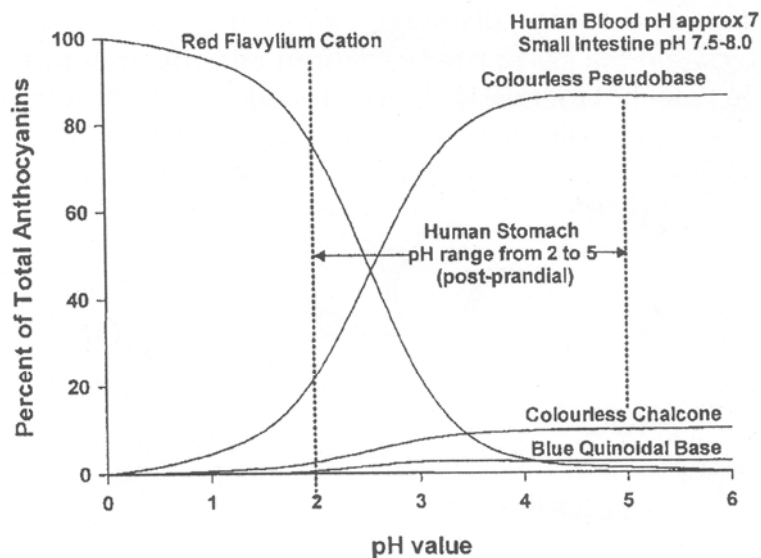
Samotné anthokyanany jsou značně nestabilní a citlivé na degradaci. Jejich stabilita je ovlivněná mnoha faktory jako jsou pH, teplota, světlo, přítomnost kyslíku popř. jiných sloučenin [4].

### 2.2.2.1 Vliv pH

Anthokyanany se mohou nacházet v různých chemických formách, jejichž podoba je závislá na pH roztoku. Při pH přibližně 1 existuje anthokyan ve formě flavyliového kationtu, který je oranžový až červený. Při vzrůstajícím pH pozorujeme úbytek červeného zbarvení a vznik 3 sloučenin, žlutě zbarvený chalkon, bezbarvou hemiacetalovou formu antokyanu a modře zbarvenou chinoidalovou bázi. Při pH=7 a výše dochází k degradaci anthokyanů. Takže můžeme říci, že anthokyanany jsou stabilní v kyselém prostředí. Průběh můžeme vidět na obrázku 2 a 3 [4, 5].



Obrázek 1. Rovnováha anthokyanů v závislosti na pH



Obrázek 2. Vliv pH na stabilitu antokyanu [8]

Na výsledné zbarvení anthokyanu při určitých hodnotách pH má vliv i jeho struktura. Některé anthokyanové transformační produkty zůstávají ve flavyliové formě i při pH=6. Toto můžeme pozorovat u anthokyanů, které mají pouze jednu hydroxylovou skupinu na B kruhu. Mezi ně patří 3-glukosidy peonidinu a malvidinu a poskytují modré zbarvení. Petunidin a delfidin a vykazují nižší stabilitu při těchto hodnotách pH [5, 8].

Stabilita a barevná intenzita je ovlivněna acylací glukosidu. Acylované antokyaniny vykazují nižší citlivost na změnu pH a modřejší zbarvení než neacylované formy [5].

#### 2.2.2.2 Teplota, světlo

Protože anthokyaniny snadno podléhají degradaci, hrají podmínky skladování důležitou roli v udržení stálé barevnosti. Nejlepší podmínky zastanou chladná a tmavá místa neboť přítomnost slunečního světla a vyšší teploty vedou ke ztrátě pigmentace. Rozklad anthokyanů roste úměrně s teplotou skladování. Vystavení anthokyanů teplotě 65–90 °C na krátký čas vede ke snížení barvy až o polovinu. Nejvhodnější teplota pro skladování anthokyanů a produktů, které je obsahují se pohybuje v rozmezí 2–4 °C [5].

#### 2.2.2.3 Oxid siřičitý

Oxid siřičitý se používá při výrobě vína jako inhibitor mikrobiologického růstu. Působí intenzivně, rychle, konzervačně a redukčně. Redukuje mnohé látky vína, včetně polyfenolů, čímž se zvyšuje stabilita a kvalita vína. Hlavní příčinou aplikace oxidu siřičitého do moštů a vín je jeho schopnost vázat se na acetaldehyd, který postupně vzniká při alkoholovém kvašení moštů a dokvácení vín. Nicméně jeho koncentrace ve víně musí být kontrolována, protože má bělicí účinky. Na molekulu anthokyanu působí jako nukleofil, který napadá flavyliový kation za vzniku bezbarvé hemiacetalové formy. Vratná reakce může být popsána takto:  $AH^+ + HSO_3^- \leftrightarrow AH-SO_3H$ . Rovnovážná konstanta této reakce je velká a naznačuje, že již malé množství volného  $SO_2$  může odbarvit obrovské množství anthokyanů. Předpokládá se, že  $SO_2$  napadá přednostně pozici C4. Takže v případě, že je flavyliový iont na této pozici substituován, zejména objemnými molekulami, tak je bělicí účinek oxidu siřičitého nižší [1, 5, 12].

#### 2.2.2.4 Polyfenoloxidázy

Anthokyany jsou rozkládány oxidačním mechanismem zahrnujícím enzym polyfenoloxidázu (PPO). Tyto enzymy se nacházejí především v hroznech, borůvkách a jahodách. Způsobují hnědnutí džusů tohoto ovoce. Nicméně, samotné PPO nemohou degradovat anthokyany, potřebují pro svou aktivitu určitý substrát. A tím je např. kyselina kávová, kyselina chlorogenová nebo kyselina gallová. Všechny tyto kyseliny jsou *o*-difenolové sloučeniny, které jsou taky přítomny v ovoci a jsou zahrnuty do prvního kroku polyfenolické oxidace. Kyselina je oxidována na její *o*-chionovou formu, která poté oxiduje anthokyany za vzniku hnědých polymerů [5].

Tvorba chinonu je zásadní pro oxidaci polyfenolových sloučenin. Jejich redukcí můžeme inhibovat oxidační degradaci anthokyanů. Jako redukční činidlo se používá např. kyselina askorbová. Vitamin C je donorem vodíkových atomů a přeměňuje chinony zpět na jejich kyselinovou formu. Tak dlouho, jako je ve směsi přítomný vitamin C, tak dlouho jsou anthokyany chráněny proti PPO. Je tedy dostatečně silným redukčním činidlem. Na druhou stranu, kyselina askorbová má dodatečný degradační efekt na anthokyany. Pokud je kyselina askorbová přítomna v roztoku anthokyanů, do kterého je zároveň zaváděn kyslík, tak dochází k destrukci obou sloučenin [5].

#### 2.2.2.5 Kopigmentace a polymerace

Je to jev, kdy dochází ke sdružování barviv s tzv. kopigmentačními kofaktory, také nazývanými jako kopigmenty. Tyto sloučeniny jsou většinou bezbarvé. Mohou to být další fenolické sloučeniny (flavanoly, flavan-3-ol, fenolické kyseliny a polyfenoly), kovové ionty, organické kyseliny, aminokyseliny nebo polysacharidy [4, 5, 7].

Kopigmentace je založena na dvou efektech (1) formace  $\pi$ - $\pi$  komplexu, která zapříčiňuje změny ve spektrálních vlastnostech molekul. Zvyšuje intenzitu absorpce (hyperchromní efekt) a zvyšuje vlnové délky (bathochromní posun). Absorpční maxima jsou pak o 5–20 nm vyšší. (2) stabilizace flavyliového modelu  $\pi$ -komplexem, rovnováha je přemístěna takovým způsobem, že stoupá intenzita červeného zabarvení [4, 7].

Kopigmenty tvoří systém bohatý na  $\pi$ -elektrony. Tyto elektrony jsou schopny asociace s flavyliovým iontem, který je spíše chudý na elektrony. Toto připojení poskytuje ochranu proti hydrataci a možnosti vzniku bezbarvé hemiacetalové formy [4].

Ionty kovů mohou představovat pro náš organismus určité riziko. Takovými ionty jsou např.  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ . Anthokyany mají schopnost tyto ionty vychytávat. Reakce se účastní barviva s *o*-dihydroxy uspořádáním na kruhu B. Tedy, kyanidin, delfidin a petunidin tvoří komplexní sloučeniny s ionty kovů, malvidin a peonidin nikoliv. Interakce stabilizuje modrou chinoidalovou bázi při  $\text{pH}=4,5$  [4, 7].

#### Stabilita kopigmentovaných sloučenin

Velikost kopigmentačního jevu je závislá na  $\text{pH}$ , teplotě, povaze kopigmentu, množství anthokyanů a kopigmentu. Kopigmentace zvyšuje barevnou intenzitu při  $\text{pH}$  okolo 2–7. Kopigment stabilizuje nejenom flavyliový ion, ale i chinoidalovou bázi. V alkalickém prostředí dochází k zániku kopigmentačního efektu [5].

Ačkoliv se kopigmentace používá k zesílení barevných odstínů tím, že stabilizuje flavyliový iont resistencí vůči vodě, tak to nemusí nutně znamenat zvýšení stability anthokyanů s ohledem na teplotu a přítomnost světla. Zahřívání kopigmentovaných anthokyanů zapříčiňuje disociaci komplexu a tím dochází k poklesu barevnosti ve stejné míře

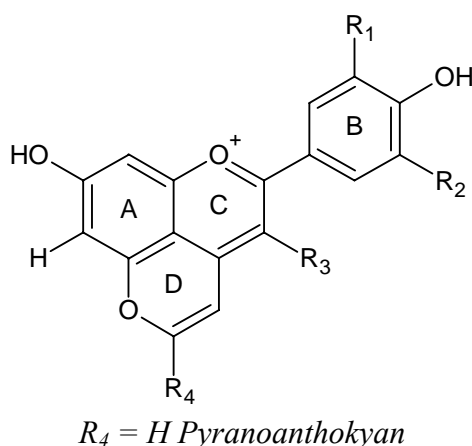
jako u nekopigmentovaných anthokyanů. Vliv UV nebo viditelného světla na stabilitu anthokyano-kopigmentovaných komplexů má obdobný efekt jako u anthokyanů bez kopigmentů. I když odbarvení trvá delší dobu [5].

Organická rozpouštědla narušují fyzikální spojení, které můžeme pozorovat u kopigmentace. Vyšší původní hodnoty kopigmentace před kvašením vína se snižují v průběhu fermentace. Přídavek ethanolu do vodného kopigmentovaného roztoku anthokyanů totiž snižuje kopigmentační efekt [3, 14].

### ***Kopigmentační efekt ve vínech***

Ve vínech je důležitá kopigmentace anthokyanů s kyselinou pyrohroznovou. Sloučeniny se nazývají pyranoanthokyaniny. Kyselina pyrohroznová se naváže na pozici C4 a hydroxylovou skupinu navázanou na C5 původní anthokyanové struktury. Vytvoří se 4 kruh, který je zodpovědný za zvýšení stability této struktury. Komplex je více stabilní vůči vyšším hodnotám pH a vyšším koncentracím SO<sub>2</sub>, protože nukleofilní atak vody nebo SO<sub>2</sub> obvykle probíhá na pozici C4, která je nyní blokována. Bylo také prokázáno, že koncentrace těchto sloučenin stoupá s dobou skladování červených vín [4, 5].

Úloha kopigmentace v průběhu fermentace vín může být dvojitá. První, vazba volných anthokyanů do kopigmentovaných forem umožní zadržení více pigmentů, což má za následek vyšší celkový obsah anthokyanů ve vínech. Druhá, kopigmentované anthokyaniny poskytují mnohem intenzivnější barvu než kdyby se vyskytovaly ve volné formě. Vína vyrobená z hroznů, které mají nízký obsah kopigmentů nejsou schopny tvořit tolik kopigmentačních komplexů a mají celkový nižší obsah pigmentů. To se zdá být případem Pinot noir a Sangiovese. Vysvětluje to jev, kdy vznikají méně intenzivně zbarvená vína z hluboce tmavých hroznů. Jiná vína, z hroznů bohatých na kopigmenty, mohou formovat více kopigmentačních komplexů a mají hlubší zbarvení s modrými až fialovými tóny, které charakterizují významnou kopigmentaci. Díky těmto reakcím jsou v roztoku vína s nižší koncentrací volných anthokyanů a fenolických sloučenin, což může vést k částečné ochraně proti oxidaci [7].



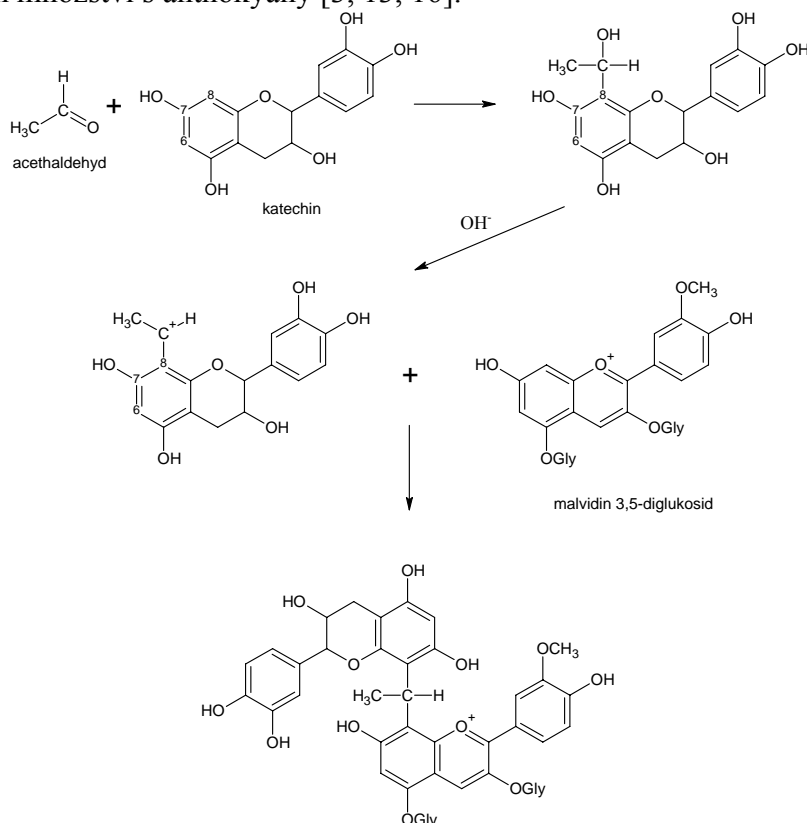
### ***Vlastní asociace anthokyanů***

Zvláštním typem kopigmentačních reakcí jsou vlastní asociace anthokyanů. Při stárnutí vína, dokonce i při jeho fermentaci, monomerní formy anthokyanů jsou postupně nahrazeny dimerními pigmenty, které vznikají spojováním anthokyanů navzájem. Na rozdíl od kopigmentace, vlastní asociace anthokyanů je charakterizována hypsochromním posunem ve vlnových délkách. To znamená k nižším hodnotám absorpčního maxima. Dimerní

pigmenty jsou méně ovlivnitelné pH a SO<sub>2</sub>. Zvýšenou teplotou se štěpí na monomerní formy anthokyanů [7, 13].

### ***Polymerační reakce zahrnující acetaldehyd***

Acetaldehyd vzniká ve víně působením mikroorganismů během fermentačních procesů nebo autooxidací ethanolu v přítomnosti kyslíku. Vzájemná oxidace *o*-difenolových skupin ve víně vede ke vzniku meziprojektu peroxidu vodíku a ten potom oxiduje ethanol za vzniku acetaldehydu. Timberlake a Bridle navrhli reakční mechanismus, který je zahájen tvorbou karbokationtu acetaldehydu. Tento iont je schopný reagovat s aktivními 6 a 8 pozicemi sloučenin katechinového typu. Vznikne acetaldehyd-katechinový komplex. Reaktivní uhlíkový iont se spojuje s anthokyanovým flavyliovým iontem, nejčastěji v pozici 8. Produktem je C8-C8 dimer spojený CH<sub>3</sub>-CH mostem. Tato sloučenina je kopigmentačním komplexem, který zvyšuje barevnou intenzitu vína a stabilizuje modrou chinoidalovou bázi, jak bylo popsáno výše. Koncentrace volných anthokyanů klesá. Průběh reakce je znázorněn na obrázku 3. V přítomnosti kyslíku a tedy dalším spojováním takto vzniklých sloučenin vznikají polymery, které jsou příčinou tzv. hnědnutí vína. V průběhu času se stávají polymery více či méně rozpustnými, mohou se z roztoku srážet, což vede ke snížení barevné intenzity. V přítomnosti acetaldehydu vzniká 2–3krát více polymerů než v jeho nepřítomnosti. V případě nadbytku acetaldehydu vzniká 2–3krát více polymerů než když je acetaldehyd v ekvimolárním množství s anthokyanem [3, 13, 16].



Obrázek 3. Reakce acetaldehydu s katechinem a malvidin 3,5-diglukosidem

### ***Polymerace bez přítomnosti acetaldehydu***

K polymeraci dochází i v nepřítomnosti acetaldehydu. Anthokyany se s fenolovými sloučeninami vážou přímo za vzniku oranžově zbarvených polymerů. Přímá kondenzace probíhá o moc pomaleji než polymerace zprostředkovaná pomocí acetaldehydu. Anthokyan se

svou pozicí 4 připojuje na jiný flavonoid nejčastěji do polohy 8. Vznikne bezbarvý antokyan-katechinový produkt, který může být oxidován dalším flavyliovým iontem a poskytne barevný dimerní flavylium-flavanový pigment. Použitím oxidu siřičitého, který obsazuje právě pozici 4 na aglykonové kostře eliminuje možnost průběhu těchto reakcí [8].

### **2.2.2.6 Antioxidační aktivita a vliv na člověka**

Anthokyany jsou sloučeniny s nedostatkem elektronů. Proto jsou obzvláště reaktivní vůči kyslíkovým radikálům. Omezují jejich aktivitu, převádějí je do méně reaktivních forem nebo nereaktivních stavů. Tím omezují proces oxidace v organismu nebo ve směsích, kde se vyskytují [5].

Studie potvrdily jejich antioxidační vlastnosti. Ty vyplývají z jejich chemické struktury, zejména z přítomnosti OH skupin v pozici 3 na kruhu C anebo taky v pozici 3' a 4' na kruhu B. Přítomnost hydroxylové skupiny na kruhu C umožňuje chelataci kovových iontů, jako jsou železo nebo měď. Kyanidin, delfidin a petunidin s *o*-dihydroxy substituenty jsou tedy nejvhodnější pro oxidaci. Antioxidační aktivita stoupá s acylací cukerných zbytků aromatickými hydroxykyselinami. Je také známo, že anthokyany mají vyšší antioxidační aktivitu než vitamin E, kyselina askorbová a  $\beta$ -karoten [4, 5, 9].

Rostliny bohaté na anthokyany se odedávna používají na léčbu mnoha symptomů a chorob. Barviva pomáhají při prevenci kardiovaskulárních chorob např. srdečního infarktu. Toto je založeno na schopnosti těchto produktů snižovat možnost vzniku zánětu, zvyšovat sílu kapilárních cév a jejich propustnost, inhibovat krevní destičky. Podporují jaterní buňky a vykazují ochranné vlastnosti proti žloutence typu A a B. Působí preventivně proti obezitě a cukrovce. Tyto sloučeniny jsou schopné zachytit volné radikály od donorových fenolových vodíkových atomů. Což je důvod pro jejich antikarcinogenní aktivitu. Anthokyany mají antibakteriální vlastnosti. Mohou například inhibovat, mimo jiné, přilnavost bakterií na slizkové membrány močových cest. Kyanidin-3-ruthinosid zvyšuje noční vidění díky jeho vlivu na regeneraci rhodopsinu [4, 5, 9].

## **2.2.3 Chování anthokyanů v průběhu výroby a skladování vína**

### **2.2.3.1 Výroba vína**

Podmínky výroby vína a jeho zrání má veliký dopad na barvu růžového a červeného vína. Extrakce anthokyanů a příbuzných fenolových sloučenin začíná nadrcením hroznů. Macerací dochází k vyluhování barviv do vína a konečnou fází jsou fermentační procesy. Prudké nadrcení hroznových výlisků zvýší extrakci a difúzi barviv. Mimo jiné také zvýší extrakci dalších fenolových sloučenin přítomných v jednotlivých částech bobule a výsledná vína jsou pak trpká a hořká. Mimoto se zvyšuje enzymatická oxidace fenolových sloučenin, což může vést k hnědnutí moštů a vyvolání nevhodných sensorických charakteristik vína [3].

Optimální teplota fermentace je asi 20–25 °C. Zvýšením teploty na 50–60 °C při fermentaci rmutu anebo na 30–40 °C po hlavní fermentaci může zvýšit extrakci červených pigmentů stejně jako chuťových látek [3].

Macerace je charakterizovaná difúzi anthokyanů a dalších fenolových sloučenin z hroznového roztoku do moštu. Může nastat buď při tepelné vinifikaci ještě před samotnou fermentací nebo během alkoholového kvašení. Tepelnou vinifikací rozumíme krátkodobé zahřátí hroznů na teplotu 60–70 °C, stlačení a ochlazení rmutu před fermentací. Tento tepelný zákrok uvolní více anthokyanů než při běžné teplotě fermentace [10].

Pro vína produkována tradičním způsobem výroby je nejvhodnějších 5–6 dní vyluhování pro získání vhodných barevných a chuťových charakteristik. Záleží však na typu vína. Při kvašení vzniká tzv. rmutový oblouk, což jsou slupky bobulí nadnášeny vznikajícím oxidem uhličitým. Tento oblouk je potřeba ponořovat, aby byl zajištěn stálý styk slupek se rmutem aby bylo vyluhováno co největší množství červených barviv. Tomuto ději říkáme nakvácení [3, 10, 28].

### **2.2.3.2 Skladování a stárnutí vína**

Vína jsou skladována v dubových, sekvojových, betonových, ocelových nebo železných nádobách. Pro červená stolní a dezertní vína se pro skladování upřednostňují dubové nádoby. Dubový sud bývá vzduchotěsný nebo spíše porézní. Vzduch proniká póry pomalu. Červená vína, která mají střední obsah fenolových sloučenin, odpovídajícímu 1100–800 mg gallové kyseliny, (GAE)/l, se obvykle skladují v dubových sudech 2 dny. Toto skladovací období v sudech se nazývá fáze zrání. Po ní následuje fáze stárnutí vína, při které je víno skladováno v lahvích. Obecně platí, že zrání v dubových sudech je rychlejší než v kovových [3].

V průběhu těchto fází, v přítomnosti kyslíku, dochází k snížení zbarvení červených vín a ke snížení absorbance. Tyhle změny v barevných charakteristikách a vlnových délkách způsobují vznikající polymerní sloučeniny. Vznik polymerních sloučenin má také za následek změny v chuťových charakteristikách vína. Snižují trpkost a hořkost. U mladých vín s krátkou fází stárnutí dochází spíše ke kopigmentačním reakcím a tedy vykazují vyšší hodnoty absorbancí. Každá odrůda vína má svoje časové optimum, kdy dochází k ustálení jeho kvality, po tomto období jeho kvalita v lahvích zhoršuje [1, 3].

Vliv teploty na barevnou intenzitu při skladování vína je přisouzen dvěma fyzikálně-chemickým procesům. První je endotermní povaha strukturně pozměněných anthokyanů a posun jejich rovnováhy při vyšších teplotách k bezbarvé hemiacetalové formě. Druhý proces se týká zvýšení disociace kopigmentačních komplexů a acetaldehydicky zprostředkovaných kondenzačních produktů při vyšších teplotách [3].

### **2.2.4 Zisk antokyanů**

Obrázek 4 na konci kapitoly ukazuje přehled procesů, které vedou k získání požadovaných anthokyanů. Prvním krokem je separace semen od hroznových výlisků. Z rozemletých semen vyrábíme extrakcí oleje. Kvašení výlisků poskytuje ethanol, který může být použit k fortifikaci dezertních vín. Vínany získáme extrakcí kontinuálními nebo dávkovacími postupy. Anthokyaniny jsou asi nejhodnotnější složkou hroznových výlisků. Je mnoho metod k jejich získávání [3].

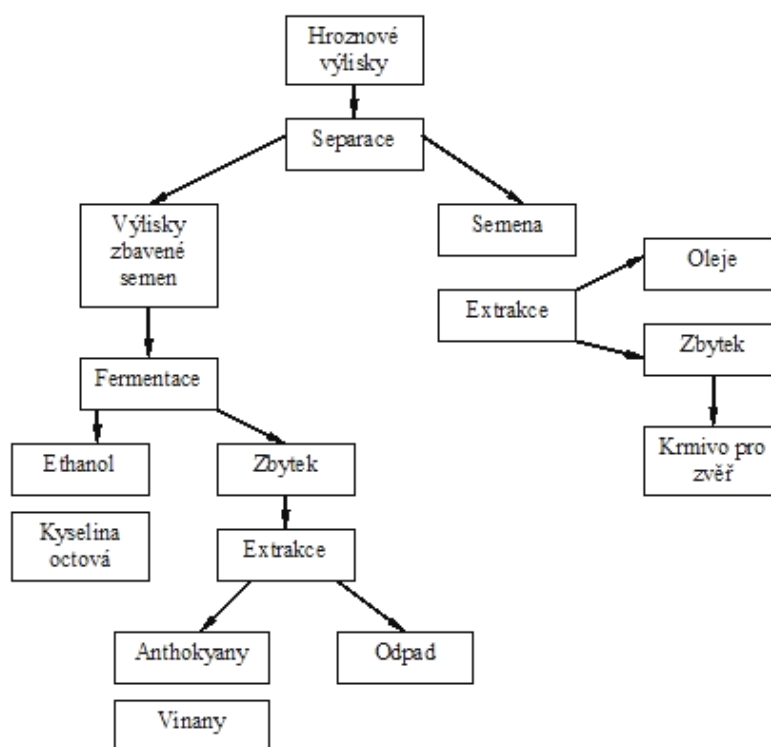
Jednotlivé metody výroby se liší od požadavků spotřebitele a charakteristik dostupných hroznových výlisků. Největší produkce anthokyanů v současné době připadá na region Reggio Emilia v Itálii [3].

Anthokyaniny jsou polární molekuly. Nejběžnější rozpouštědla, která se užívají pro jejich extrakci jsou vodné roztoky ethanolu, methanolu nebo acetonu. Methanolová extrakce je o 20 % účinnější než ethanolová a o 73 % účinnější než vodná. Nicméně, v potravinářském průmyslu se preferuje ethanol, kvůli toxicitě methanolu [4].

Mimo ethanolové nebo acetonové extrakce se běžně využívá procesu s roztokem kyseliny siřičité ve vodě. Jednotlivé kroky zahrnují: (1) maceraci výlisků ve slabém roztoku oxidu siřičitého po dobu 48–72 hodin, (2) oddělení vodné fáze z opracovaných výlisků a

(3) vakuové zkoncentrování vodného extraktu s nebo bez přidání ethanolu. Vodný roztok oxidu siřičitého se používá na zabránění oxidace pigmentů a pomnožení mikroflóry [3].

Oddělení vodných pigmentových extraktů je obvykle docíleno samo odtokovými trubkami z jedné nádrže do druhé. Extrakty jsou prakticky bezbarvé tekutiny a zůstávají v takovém stavu po dobu přítomnosti oxidu siřičitého. Zředěný vodný pigmentový roztok je poté filtrován, desulfurován a zkoncentrován vakuovým odpařováním při teplotách 40–45 °C. Produktem může být intenzivně zbarvený koncentrát anebo tmavě-červený ve vodě rozpustný prášek [3].



Obrázek 4. Diagram procesů vedoucích k získání barviv

## 2.2.5 Purifikační metody

Dosud navržené extrakční metody nejsou zcela selektivní pro anthokyany. Spolu s nimi je extrahována celá řada sloučenin. Proto byly navrženy purifikační metody, abychom získali požadované anthokyany. V tomto smyslu byla navržena celá škála technik, od extrakce v pevné fázi (SPE) a kapalně v fázi (LLE), po chromatografické metody, jako rozdělovací sloupcová chromatografie (CC), středotlaká kapalinová chromatografie (MPLC), vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC) a další [4].

Extrakce v pevné fázi probíhá na C18 nebo Sefadexových nosičích. Anthokyany se svými hydroxylovými skupinami pevně vážají na nosič. Zvyšováním polarity rozpouštědla jsou následně separovány od ostatních sloučenin. CC se používá jako purifikační metoda s následnou HPLC, která nám umožní objasnit strukturu látky. Nejužívanější metodou pro separaci anthokyanů je HPLC/UV/Vis [4].

## 2.2.6 Metody stanovení anthokyanů

Slouží k identifikaci nebo objasnění struktury jednotlivých anthokyanů. Přičemž analýza anthokyanů je složitá kvůli jejich schopnosti podléhat strukturním transformacím a jejich podobností s jinými flavonoidy [5].

### 2.2.6.1 Jednoduché spektrální metody

Anthokyaniny vykazují absorpční maximum při hodnotách 520–535 nm a minimum při 420 nm. Se stárnutím vína dochází k poklesu absorbance při 520 nm a zvýšení absorpčního minima při 420 nm, kvůli změně monomerních forem na polymerní. Hustota barvy je definována jako suma absorbancí při 420 nm + 520 nm. V současnosti se doporučuje přičíst i absorbanci naměřenou při 620 nm kvůli mladým vínům [5].

### 2.2.6.2 Kapilární elektroforéza

První anthokyanová analýza pomocí kapilární elektroforézy (CE) byla provedena v roce 1996.

Běžně se používá pět typů kapilární elektroforézy k separaci biopolymerů. Přičemž pro separaci, identifikaci a kvantifikaci anthokyanů se nejvíce používá zónová kapilární elektroforéza (CZE). Molekuly se separují na základě elektroforetické migrace a elektroosmotického toku. Elektroforetická migrace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli, elektroosmotický tok je tok elektrolytu způsobený nábojem vnitřní stěny kapiláry a aplikovaným potenciálem. Různé molekuly se pohybují různou rychlostí a různými směry podle náboje. K separaci neutrálních molekul nedochází, nýbrž jsou unášeny jako jeden pás [5, 21].

Metoda vyniká svou hmotnostní citlivostí, vysokým rozlišením, nízkou spotřebou vzorku a minimální produkcí odpadu. Zařízení se skládá ze dvou nádrží a tavené křemičité kapilární trubice, zdroje napětí a detektoru. Vzorek je vnesen do kapilární trubice k anodě a mobilní fáze může pohybovat s některými komponentami směrem ke katodě, zatímco jiné jsou zadržovány vzadu u anody. K tomuto ději dochází na základě přitažlivosti nebo odpuzování elektronů [5].

V dnešní době se separují anthokyaniny metodou, která užívá zásadité prostředí obsahující pufr tetraboritanu sodného při pH=8,4 s 15% methanolem. Methanol zde působí jako modifikátor, který zvyšuje citlivost metody. Separace molekul probíhá za kladného polárního režimu a kladného elektroosmotického toku s tokem molekul ve směru od anody ke katodě. Detekci provádíme pomocí UV/Vis při 599 nm. Elektrochromatogram poskytuje modré chinoidalové formy anthokyanů. Pro kvantitativní účely stanovujeme kalibrační křivku používající malvidin-3-glukosid jako standart [5].

Použitelnost zásaditého média je limitována nestabilitou anthokyanů v bazickém prostředí. Proto se může použít kyselé médium a nastavit systém na opačný program, tedy pohyb molekul od katody k anodě. Kyselé prostředí zajišťuje setrvání anthokyanů ve flavyliových formách [5].

Jako další metodu můžeme použít micelární elektrokinetickou kapilární chromatografii (MEKC), která se osvědčila při separaci anthokyanů ze slupek hroznů [4, 5].

### 2.2.6.3 Historické chromatografické metody

Papírová chromatografie (PC) a tenkovrstvá chromatografie (TLC) patří mezi historicky používané techniky k separaci anthokyanů. Papírová chromatografie byla první metodou

používanou pro purifikaci anthokyanů a poskytovala dobré výsledky pro některé pigmentové směsi. Bohužel nepřipouštěla získání většího množství čistých anthokyanů a vyžadovala mnoho času na vyvinutí chromatogramu. S použitím tenkovrstvé chromatografie byly získány nějaké výhody jako je např. menší spotřeba směsi pro analýzu, kratší čas eluce a poskytuje lepší výsledky než papírová chromatografie. Navzdory mnoha jejich stinných stránek se používají jako rutinní metody v mnoha laboratořích díky jejich nízké ceně [5].

#### **2.2.6.4 Vysoko-účinná kapalinová chromatografie**

Chromatografie se úspěšně používá k separaci a identifikaci anthokyanů z hroznů a vín od roku 1950. V současnosti je vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC) nesmírně účinným nástrojem k určení kvalitativních a kvantitativních znaků anthokyanů a fenolových sloučenin [11].

Vysoko-účinná kapalinová chromatografie anthokyanů používá opačný sled fází (RPC). To znamená, že má nepolární stacionární fázi a polární mobilní fázi. Stacionární fázi tvoří C18 polymer navázaný na křemennou podpěru nebo dnes více používané polymerní sloupce, které jsou stabilní v širším rozsahu pH. Mobilní fázi je obvykle gradient, jehož základ tvoří voda, kyselina a organický modifikátor. Malé množství kyseliny je nezbytné pro stabilizaci anthokyanů a tvorbu ostrých píků. Nejčastěji se používají kyselina fosforečná, chloristá, octová a mravenčí. Nejběžnější organický modifikátor je methanol nebo acetonitril [5].

V chromatografii s opačným sledem fází, retenční čas klesá s rostoucí polaritou, která odpovídá vzrůstajícímu počtu hydroxylových skupin na flavyliovém iontu. Elutáty jdou v pořadí od delfidinu přes kyanidin, petunidin, peonidin a nakonec malvidin. Kvůli opačnému sledu fází mají diglykosylované anthokyany nejmenší retenční časy, následují monoglykosylované anthokyany, aglykony a naposledy acylované anthokyany [5].

V kyselém prostředí je flavyliový kation zbarvený do červena a poskytuje charakteristické absorpční maximum při 520 nm. Při této hodnotě nedochází k ovlivňování jinými fenolovými sloučeninami přítomnými v rostlinném extraktu [5].

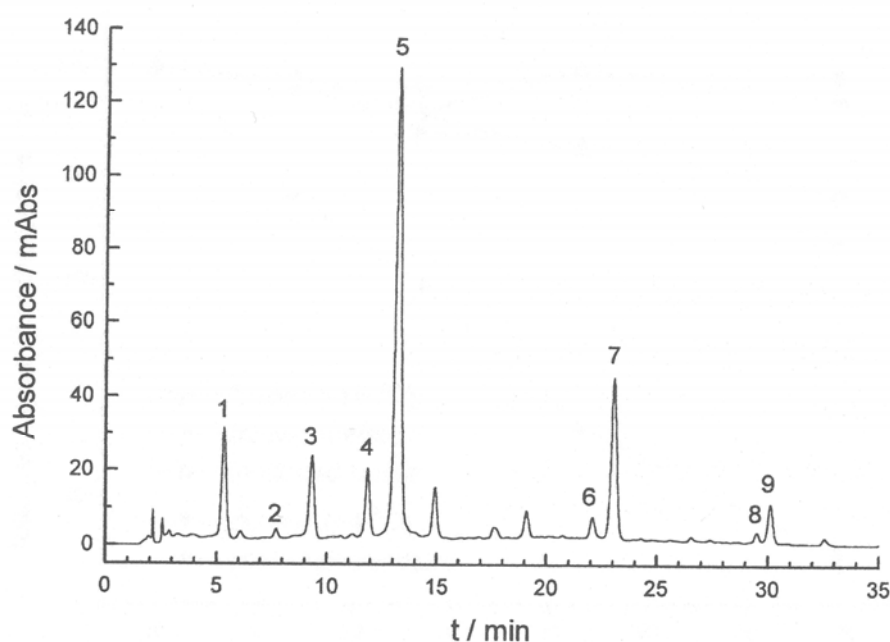
#### **HPLC s UV detektorem**

Nejčastěji používaná detekční metoda pro HPLC je UV/Vis spektrofotometrie. Anthokyany mají specifické absorpční maximum při 520 nm, které staví tyto sloučeniny stranou od ostatních flavonoidů. Vzorek HPLC s detekcí UV/Vis můžeme vidět na obrázku 5 a popis jednotlivých píků v tabulce 2. Spektrální charakteristiky jednotlivých anthokyanů souvisí s hydroxylovými skupinami na aglykonové struktuře. Peonidin a kyanidin vykazují absorpční maxima při 535 nm, delfidin, petunidin a malvidin mají své maxima při 544 nm [5, 11].

Pokud jsou ve vzorku pro HPLC přítomny polymery anthokyanů, tak vznikají široké a hrbolaté píky. Separaci monomerních, oligomerních a polymerních anthokyanových frakcí můžeme dosáhnout pomocí C18 sloupců jako jsou C18 Sep-Pak nosiče nebo Absorbex RP-18 sloupec a následným vymýváním různými rozpouštědly se stoupající polaritou. Jako alternativní metoda k separaci monomerů od polymerních pigmentů se užívá gelová filtrace. Sada Sefadex G gelů může být použita pro separaci fenolů podle velikosti a pomocí sefadexu LH-20 dělíme monomery od polymerů podle jejich tendence vázat se vodíkovými můstky. LH-20 je akceptor vodíkových vazeb. Polymerní molekuly jsou tedy zadrženy pevněji než monomery [6, 11].

Tabulka 2. Vzorek anthokyanů vína Cabernet Sauvignon

Pík	$t_R$ [min]	Anthokyan
1	5,3	Delfidin-3-glukosid
2	7,7	Kyanidin-3-glukosid
3	9,3	Petunidin-3-glukosid
4	11,9	Peonidin-3-glukosid
5	13,2	Malvidin-3-glukosid
6	22,1	Peonidin-3-acetylglukosid
7	23,0	Malvidin-3-acetylglukosid
8	29,5	Peonidin-3-kumarylglukosid
9	30,1	Malvidin-3-kumarylglukosid



Obrázek 5. Chromatogram vína Cabernet Sauvignon [Balint]

### HPLC s detekcí hmotnostní spektroskopie

Spojení vysoko účinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektroskopií (HPLC/MS) se rozvinulo v posledním desetiletí. Hmotnostní spektroskopie je citlivá metoda molekulární analýzy. Poskytuje výborné selektivní a identifikační výsledky jednotlivých sloučenin ve směsi. Analýza specifických typů sloučenin vyžaduje vhodnou ionizační techniku pro převedení molekulárního iontu do přístroje. Nejvhodnější ionizační techniky pro anthokyany jsou: ionizace ostřelováním vzorku rychlými atomy (FAB), ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a elektrosprejem nebo termosprejem (ESI). V dnešní době se asi nejvíce využívá metoda HPLC/MS/ESI. ESI je mírná ionizační metoda. Převodu iontů z kapalně fáze do vakua je dosaženo rychlým odsušením mikrokapiček. Metoda je vhodná pro malé rostlinné metabolity jako jsou právě anthokyany. Jako analyzátoři nám slouží: průletový analyzátor (TOF), kvadrupulový hmotnostní filtr anebo kvadrupulová hmotnostní past [5, 20].

### **HPLC spojená s nukleární magnetickou rezonancí**

Zatímco metody HPLC/UV/Vis nebo HPLC/MS jsou velmi efektivní analytické metody pro anthokyany, použití NMR detekce spojené s HPLC převyšuje předchozí dvě metody ve strukturním vysvětlení neznámých sloučenin v surovém rostlinném extraktu [5].

V současnosti je HPLC/NMR metoda limitována na  $^1\text{H}$  NMR spektrum nebo za přímých podmínek  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum. Měření  $^1\text{H}$  spektra může probíhat za konstantního průtokového režimu. Tento režim vyžaduje vcelku vysoké koncentrace rostlinného extraktu. Spektrum se získává plynule během separace a poskytuje 2-D NMR spektrum s nízkou citlivostí. Pro preciznější měření je výhodnější režim se stopováním průtoku, který zastaví tok rozpouštědla na krátký čas [5].

#### **2.2.7 Příprava vzorků**

Kromě izolačních a kvantifikačních metod máme ještě celou řadu postupů přípravy vzorků pro analýzu. Vzorky připravujeme podle požadavků na výsledky. Vzorky musí být připravovány za nízkých teplot, kvůli citlivosti anthokyanů na vysoké teploty.

Pokud se analyzují anthokyany ze vzorku červeného vína, tak je před vlastním vstříknutím roztoku do analyzátoru provedena pouhá filtrace přes 0,45  $\mu\text{m}$  filtrační papír. Pevný materiál obsahující anthokyany vyžaduje homogenizaci a extrakci tohoto materiálu. Bobule se rozmačkají a zfiltrují. V dalším kroku se pevné zbytky extrahují. Proces oddělování slupek od dužiny a semen se provádí v atmosféře obsahující dusík, protože za přítomnosti vzduchu dochází k rozpadu barviv. Po krátkou chvíli mohou být tyto vzorky skladovány ve zmrzlém stavu. Pro dlouhodobější uskladnění vzorků se obvykle provádí vysušení materiálu lyofilizací a následné skladování v chladném a temném prostředí, abychom předešli rozkladu anthokyanů [5, 6].

Po přípravě rostlinné tkáně následuje extrakce. Anthokyany jsou rozpustné v polárních rozpouštědlech. Nejběžněji používaná rozpouštědla jsou methanol a ethanol s malým množstvím kyseliny chlorovodíkové nebo mravenčí. Přičemž použití těchto kyselin může způsobit hydrolyzu acylovaných podílů acylovaných anthokyanů, které se vyskytují v menším nebo větším množství v rostlině. Kvůli tomu se nesmí použít koncentrace HCl větší než  $0,12 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  [5, 6].

Aceton se také používá k LLE anthokyanů. Ve srovnání s ethanolem nebo methanolem poskytuje lépe reprodukovatelné výsledky. Použitím acetonu se vyhneme problémům s pektiny, které se nacházejí ve stěnách bobulí. Pektiny zakalují extrakty a zpomalují celý proces. Aceton sráží přítomné pektiny [5].

Pro extrakci na pevné fázi se používá nejčastěji C18 nosiče nebo Sefadex LH-20. Polární anthokyany se navážou na tyto adsorbenty pomocí nesubstituovaných OH skupin a jsou separovány od ostatních rostlinných sloučenin použitím rozpouštědel se stoupající polaritou [5, 6].

### **2.3 Barviva bílých odrůd vína**

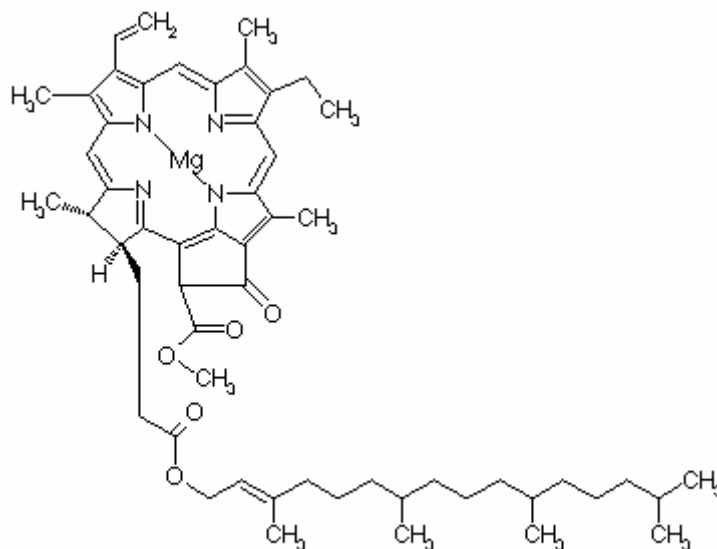
Mnoho odrůd vinné révy může být rozděleno do dvou skupin podle přítomnosti nebo absence anthokyanů ve slupkách bobulí. Regulační gen, který aktivuje biosyntézu anthokyanů není přítomen u bílých odrůd vína. Proto tedy nemohou syntetizovat tuto červená barviva. Bílé odrůdy obsahují ve slupkách bobulí převážně chlorofyl a jiná barviva. Dužina obsahuje pouze stopová množství tohoto barviva. V tabulce 3 můžeme vidět vývoj barviv v průběhu 4 měsíců. Chlorofyly jsou deriváty porfyrínu. Základem této molekuly jsou 4 pyrrolová jádra.

Karotenoidy – kyslíkaté, xantofyly – bezdušíkaté, obsahující kyslík ve formě hydroxy- nebo epoxyskupiny. Chlorofyly se při zrání hroznu postupně vytrácejí. Nejdéle se však udržují ve vnějších vrstvách buněk slupky. Odtud se lisováním dostávají do moštu spolu s karotenoidy. Jejich množství v mošttech se zvyšuje v případě, když se rozemleté hrozny před lisováním delší čas uskladňují a lisují při vysokých tlacích [1, 22].

Tabulka 3. Obsah zelených a žlutých barviv ve slupce bobulí [1]

Barvivo	Datum			
	23.6.	22.7	26.8	23.9
Chlorofyl A	3,2	1,0	0,9	0,24
Chlorofyl B	1,0	0,9	0,6	0,20
Suma zelených barviv	4,2	1,9	1,5	0,44
β-karoten	0,06	0,06	0,05	0,06
Lutein + lutein-5,6-epoxid	0,02	0,02	0,02	0,03
Neoxanthin	0,01	-	-	-
Suma žlutých barviv	0,09	0,08	0,07	0,09

Bílá vína jsou méně zajímavá než vína červená z hlediska jejich zbarvení. Obsahují menší množství polyfenolových sloučenin, ale na druhou stranu mají větší prospěch pro zdraví našeho těla. Majoritními sloučeninami v bílých vínech jsou flavanoly. Existují jednak v monomerní formě jako katechiny a jednak ve formě polymerní jako proanthokyanidiny známé také jako taniny. Tyto látky jsou zodpovědné za trpkou příchuť ovoce. Zahříváním v kyselém prostředí poskytují anthokyanidiny [5].

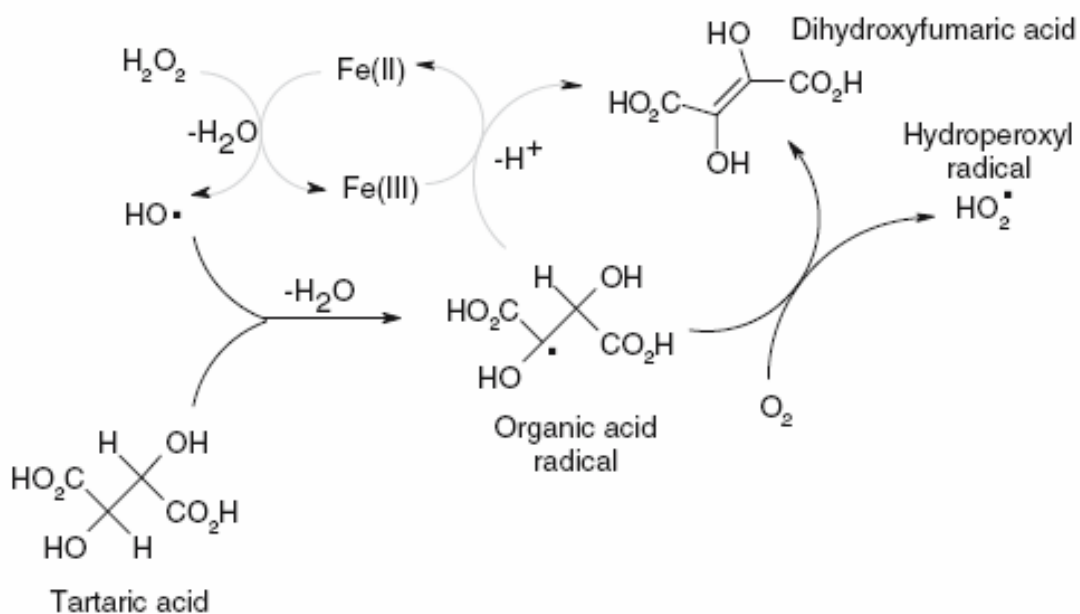


Obrázek 6. Struktura chlorofylu a [30]

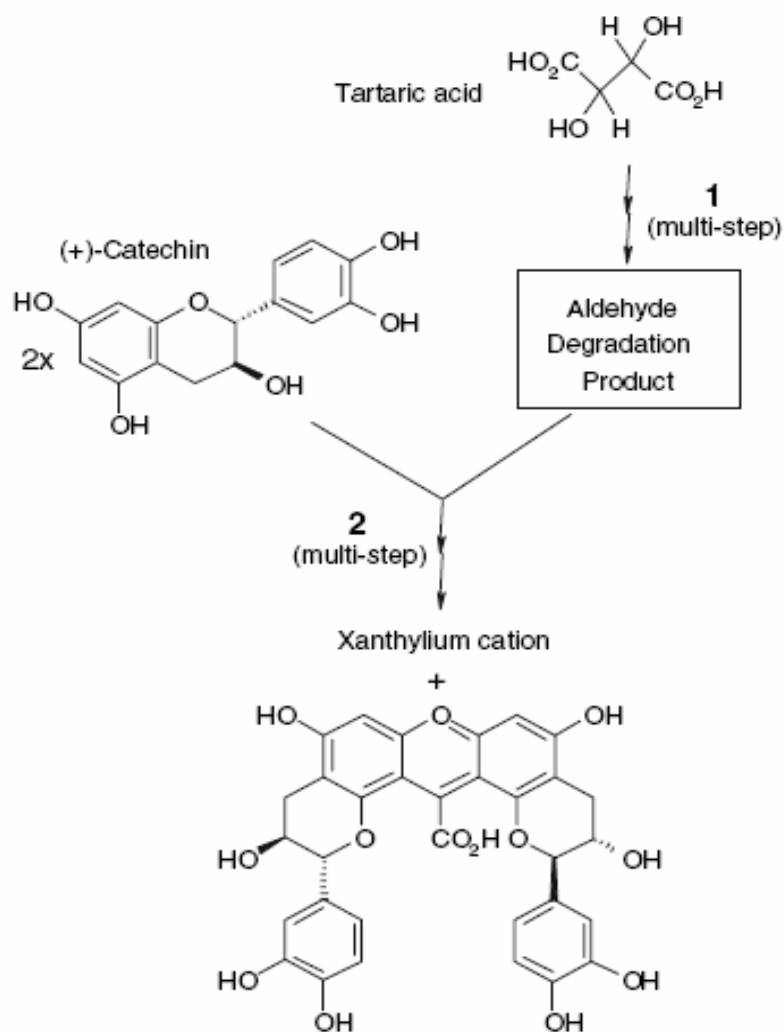
### 2.3.1 Reakce vedoucích k tvorbě žlutých pigmentů

Flavanoly, jako je (+)-katechin, jsou důležitými sloučeninami, které mají vztah se zbarvováním bílého vína. Tyto sloučeniny mohou reagovat s aldehydy, zejména glyoxylovou kyselinou, která je oxidačním produktem kyseliny vinné. Glyoxylová kyselina a (+)-katechin mohou zahájit sled reakcí vedoucích ke vzniku xantyliového kationu. UV/Vis spektrum těchto pigmentů vykazuje absorpční maximum při 440 nm [25].

Oxidace kyseliny vinné může být enzymatická nebo neenzymatická. Enzymatická oxidace ve víně je obvykle významnější po nadrcení hroznů a ještě před fermentačními procesy. Neenzymatická oxidace probíhá pomocí vzdušného kyslíku. V roztoku vína dochází k rozpouštění molekulárního kyslíku. Reakce tohoto kyslíku s fenolovou sloučeninou je komplexní proces, který je katalyzovaný malým množstvím kovových iontů, nejčastěji železnatými a měďnatými ionty. Rozpuštěním kyslíku se vytvoří reaktivní kyslíková forma jako je například peroxid vodíku. V přítomnosti malého množství kovových iontů, peroxid vodíku se může přeměnit na hydroxylový radikál, který je mnohem efektivnějším oxidačním činidlem. Tento radikál může oxidovat sloučeninu, která je v jeho bezprostřední blízkosti a dojde k vytěsnění vody. Ve vinném roztoku je takovouto sloučeninou nejčastěji ethanol, glycerol nebo právě kyselina vinná, která je nejvíce koncentrovanou sloučeninou ve víně po vodě a tudíž je nejvíce pravděpodobnou látkou k oxidaci hydroxylovými radikály. Celý proces vedoucí ke vzniku kyseliny dihydroxyfumarové popisuje obrázek 7. Dihydroxyfumarová kyselina ihned podlehne oxidační nebo dekarboxylační degradaci za vzniku množství různých 3-uhlíkatých ketonů a aldehydů a 2-uhlíkatých aldehydů. Mezi těmito sloučeninami je i kyselina glyoxylová, která reaguje s (+)-katechinem za vzniku žlutého xantyliového kationu (obrázek 8) [25, 26].



Obrázek 7. Schéma vzniku dihydroxyfumarové kyseliny[25]



Obrázek 8. Zobecněné schéma vzniku xantyliového kationu[25]

### 2.3.2 Procesy hnědnutí

Oxidační hnědnutí je dlouhodobým problémem při výrobě vína. Je to proces zahrnující cukry, lipidy, aminokyseliny a fenoly přítomné ve víně. Tento proces nepříznivě ovlivňuje sensorické vlastnosti vína, jako je ztráta barvy, chuti, aroma a zvýšení trpkosti vína. Tyto procesy jsou výraznější u vína bílého, avšak probíhají i u vína červeného. Intenzivněji dochází k těmto procesům při zpracování poškozených a nahnilých hroznů [2, 27].

Hnědnutí vína může být rozděleno na enzymatické a neenzymatické. Nejdůležitějšími enzymy zodpovědnými za hnědnutí hroznů jsou polyfenoloxidas a peroxidasy. PPO oxidují kaftarovou a kávovou kyselinu za vzniku jejich *o*-chinonových forem. Tyto sloučeniny jsou účinnými oxidačními činidly schopné oxidovat další sloučeniny ve víně a způsobovat velké změny v barevné intenzitě vína. Ošetřením vína oxidem siřičitým, vyčeřením nebo vzrůstající produkcí ethanolu, koncentrace a aktivita enzymu PPO vymizí [27].

Kyselina gallová, katechin a epikatechin jsou nejnáchylnějšími sloučeninami při neenzymatických oxidačních procesech. Za přítomnosti katalyzátoru v podobě železnatých a měďnatých iontů dochází k tvorbě *o*-chinonů těchto sloučenin. Chinony spontánně reagují s nukleofilními sloučeninami zahrnujícími fenoly nebo aminy a vzniknou polymerní, hnědě zbarvené pigmenty [27].

V počátečním stádiu je možno nahnědlé víno snadno napravit zasiřením. Je-li však v pokročilejším stádiu, projevuje se zhnědnutí i v chuti a vůni a dá se odstranit jen velmi těžce. Oxid siřičitý se přidává do vína ve formě plynné, v prášku či tabletách. Přidávky oxidu siřičitého mohou způsobovat závažné alergické reakce. Zájem o siřičitany souvisí s regulačními omezeními stanovenými Světovou zdravotnickou organizací (WHO) a Mezinárodní vinařskou organizací (O.I.V.). Kyselina askorbová je pravděpodobnou alternativou siřičitanů při výrobě zejména bílého vína. Používání kyseliny askorbové není ve Francii povoleno [2, 27].

Technika hyperoxidace snižuje množství fenolových sloučenin v moštu a chrání vína před procesy hnědnutí. Na druhou stranu, fenolové sloučeniny vykazují pozitivní vliv na zdraví člověka, a tak snižováním jejich obsahu dochází ke snižování výživové hodnoty vína [24].

## 2.4 Popis procesu lyofilizace

Sublimační sušení patří do skupiny difúzních procesů, probíhá za nízkých teplot a tlaků. Při lyofilizaci dochází k dehydrataci zmrazeného materiálu. Led a vázaná voda sublimují přímo do parní fáze. Celý proces se skládá ze zmrazení výchozího materiálu, dodání tepla sušenému materiálu, odstranění vlhkosti ze vzorku, přenosu páry do sběrače a vyloučení tepla ve sběrači, aby došlo ke kondenzaci par. V podstatě je to proces, při kterém je rovnováha mezi absorpcí tepla vzorkem, které vypařuje led a odejmutí tepla ze sběrače a převedení páry zpět na tuhou fázi [31, 33, 34].

### 2.4.1 Základní popis procesu

#### 2.4.1.1 Zmrazení rostlinného materiálu

První operací při lyofilizaci je zmrazení výchozího materiálu. Vlhkost, kterou obsahuje sušený materiál může mít následující formy: voda chemicky vázaná, adsorbovaná voda na povrchu materiálu, voda vázaná kapilárními silami a osmoticky vázaná voda (např. v buňkách biologického materiálu). S klesající teplotou dochází k jevům, které jsou uvedeny v tabulce 4 [31].

Tabulka 4. Etapy, které předcházejí sublimačnímu sušení vzorku

Teplota [°C]	Jev
-1 až -1,5	Ochlazování materiálu
-1 až -3	Zmrznutí strukturně volné vody
-2 až -20	Zamrznání volné vlhkosti eutektické hranice pro roztoky solí v buňkách
-20 až -65	Vymrznání vázané vlhkosti
-65 a méně	Sublimační sušení

Bylo prokázáno, že rychlost zmrazování materiálu má vliv na kvalitu vysušeného produktu. Při rychlém zmrazení materiálu se při jeho povrchu vytváří ledové krunýře, které brání rychlejšímu sušení. Optimální rychlost mražení je  $1 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ . Takové zamrznání umožňuje tvorbu takových ledových krystalů, které jsou nezbytné pro volný únik par ze zmrznuté matrice. Při rychlosti mražení pod  $0,5 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$  nebo mnohem větší než  $1 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ , struktura ledové matrice je taková, že proud par je zdržený během sublimace a doba sušení je významně prodloužená. Není možné dosáhnout této optimální mrazící rychlosti pokud vrstva v nádobce převyšuje 10 mm [32].

Mrazení může být prováděno na vnější mrazicí jednotce nebo na policích sublimační sušárny [34].

#### **2.4.1.2 Způsoby dodání tepla**

Kvůli zajištění určité intenzity sušení je třeba dodat do sušené hmoty množství tepla, které je potřebné k vypaření vlhkosti [33].

#### **Kontaktní sublimační sušení**

Potřebné teplo je přiváděno vedením z nahřívajícího povrchu aparátu. Mechanismus sublimačního sušení můžeme posuzovat jako sled vzájemně navazujících procesů: (a) přenos tepla a vlhkosti uvnitř sušeného vzorku (b) přenos sublimujících par od zóny sublimace k povrchu vzorku (c) přenos par z povrchu vzorku do vakuové komory [31].

#### **Radiační sublimační sušení**

Při tomto způsobu lyofilizace se využívá zdrojů infračerveného záření. Podstatou radiačního sušení je prostup infračervených paprsků vrstvou páry k povrchu sušeného materiálu. Tyto paprsky se od něj částečně odrážejí a zároveň jsou materiálem pohlceny. Energie v podobě tepla přechází dovnitř hmoty vedením, způsobuje sublimaci vlhkosti a tvoří vysušenou vrstvu na úkor vrstvy zmrazené. Sublimační zóna je tím větší, čím je vyšší tok tepla do sušeného materiálu a čím nižší je teplota zmrazeného materiálu. Na sublimační zónu má vliv i úroveň použitého vakua [31].

#### **2.4.1.3 Primární sušení**

Jakmile se dosáhne kompletně zmrzlého stavu materiálu, tlak v sublimační sušárně je snížen a je dodáno teplo k iniciaci sublimačních procesů, tak začne probíhat primární sušení materiálu. Teplo by nemělo být vzorku dodáno dříve, než je zajištěno vakuum přibližně 0,2 mBar. Mohlo by totiž dojít k rozpuštění materiálu. Sublimační páry odcházejí otvorem ve víku nádoby, která je dokonale utěsněná. Primární proces je ukončen tehdy, jakmile jsou odstraněny všechny ledové krystaly z preparátu [32, 35].

#### **2.4.1.4 Sekundární sušení**

Po skončení primárního procesu sušení je ve vzorku přítomna ještě voda vázaná. Tato vázaná vlhkost může tvořit v závislosti na teplotě a povaze vzorku asi 5 % hmotnosti usušeného produktu. Sekundární sušení desorbuje vázanou vodu ze vzorku a je obvykle konečným krokem lyofilizace [35].

### **2.4.2 Rychlost sublimačního sušení**

Účinnost lyofilizace závisí na velikosti a tloušťce sušeného materiálu, koncentraci rozpuštěné látky ve vzorku, použitém vakuu a teplotě sběrače. Silná vrstva vzorku zpomaluje sušení. Teplo je obvykle absorbováno z jedné strany zmrazeného vzorku a musí projít skrz zmrzlou vrstvu, aby mohlo dojít k vypaření vody na druhé straně povrchu vzorku. Navíc, vodní pára musí cestovat skrz již usušenou vrstvou materiálu. Velikost baněk by měla být asi 2–3krát větší než je množství vzorku. Když je tlak páry na kondenzačním zařízení nižší než na vzorku, tak dochází ke kontinuálnímu toku par směrem ke sběrači. Tento proces by probíhal pomalu za atmosférických podmínek, takže dobře zvolené vakuum je nezbytné

pro udržení plynulého procesu sušení. Doporučená hodnota v mnoha aplikacích je 13,3 Pa a méně [34].

### 2.4.3 Lyofilizační zařízení

Vyrábí se několik typů lyofilizačního zařízení. Jednotlivé komponenty si můžeme poskládat podle našich potřeb.

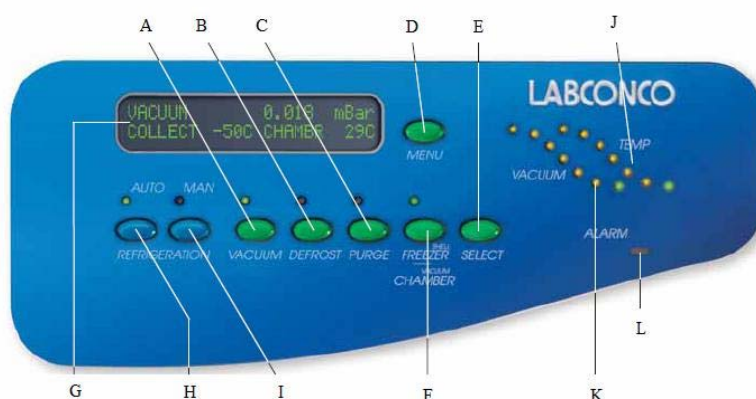
#### ***Komora sublimační sušárny***

Komora má dvě základní funkce: (1) poskytuje bezpečné prostředí pro produkt během celého lyofilizačního procesu a (2) zajišťuje potřebné teploty a tlaky k řízení každého kroku lyofilizace.

Je to kovová nádoba vyrobena obvykle z nerez oceli. Na horní straně se může nacházet spojovací poklop, který umožňuje napojení sušící komory. Na sušící komoru se připojují lyofilizační baňky se vzorkem.

V jiném typu sušárny se vzorky ukládají na police, které se nacházejí uvnitř komory. Na těchto policích dochází k zmrazení produktu. Do polic může být uložen ohřívací prvek k dodání tepla během sušení. Přenos tepla k produktu je zprostředkováno vedením nebo radiací, jak již bylo popsáno výše [32, 35].

Z vnější strany komory sublimační sušárny se může nacházet LCD displej, který monitoruje průběh sušení a případnou poruchu oznámí obsluhovači zařízení. LCD panel slouží k nastavení podmínek sušení jako je teplota polic nebo potřebný tlak v komoře a dalších [34].



Obrázek 9. Panel vymrazovacího systému [34]

A: vakuový spínač, B: spínač rozmrazování, C: odvzdušňovací spínač, D: menu ovladač, E: volič výběru požadovaného vakua, teploty nebo nastavení přístroje, F: rotační mrazák, vakuová komora, G: LCD displej nastavených parametrů přístroje a hlášení poruchy, H: spínač automatického módu chlazení, I: spínač ručního módu chlazení, J: teplotní diagram, K: vakuový diagram, L: poplašné světlo.

#### ***Vakuová pumpa***

Komora je propojená s vakuovým systémem. Funkcí tohoto systému je snížit atmosférický tlak nad zmrzlou hmotou a usnadnit tak únik par z produktu. Zařízení poskytující vhodné tlakové podmínky nezbytné pro primární a sekundární sušení se nazývá vakuová pumpa. Nejčastěji používaná čerpadla jsou dvoustupňová rotační. Typická vakuová pumpa používaná v sublimačním sušení je mazaná olejem. Bez ohledu na použité čerpadlo je nutno zdůraznit,

že pumpa pouze snižuje tlak v komoře a tím podněcuje únik molekul vody ze zmrzlého vzorku. Vakuová pumpa stlačuje nekondenzovatelné plyny, které procházejí skrz kondenzační komorou a vyprazdňuje tyto plyny přímo do atmosféry [32, 35].

### **Kondenzační komora**

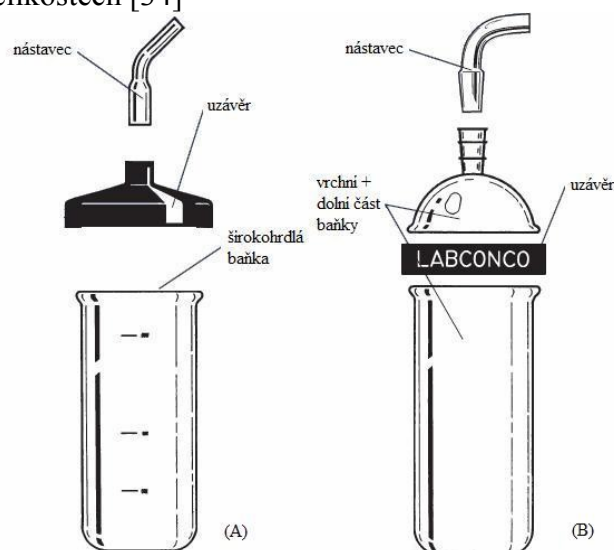
Mezi vakuovou pumpou a vzorkem se nachází kondenzační komora. Hlavní funkcí této komory je poskytovat kondenzační povrch pro odstranění vodní páry z plynů, které prošly sušicí komorou. Konstrukce komory je obvykle stočená nebo žebrovaná, aby byl její povrch co největší a zachytil tak maximum vodní páry. Teplota komory musí být asi o 20 °C nižší než teplota materiálu během primárního sušicího procesu, aby páry proudily od produktu ke kondenzační komoře. Kondenzační zařízení dělíme na vnější a vnitřní. Vnější kondenzační komora tvoří samostatně izolovanou vakuovou komoru. Pokud je kondenzační zařízení součástí sušicí komory, pak se jedná o vnitřní uspořádání [32, 35].

### **Nádoby**

Obrázek 10 zobrazuje příklady dvou typů baněk používaných při lyofilizaci. Tyto baňky se napojují na sušicí komoru zvenčí pomocí nástavců.

Baňka (A): Nástavec je vyroben buď ze skla nebo z nerez oceli, tvar může být přímý nebo ohnutý do úhlu 45°. Uzávěr je vyroben ze silikonové gumy, zajišťuje bezpečné uzavření baňky při vysokém vakuu. Široké hrdlo baňky umožňuje snadnou aplikaci vzorku a snadné očištění jejího povrchu. Baňky se vyrábí v 10 různých velikostech.

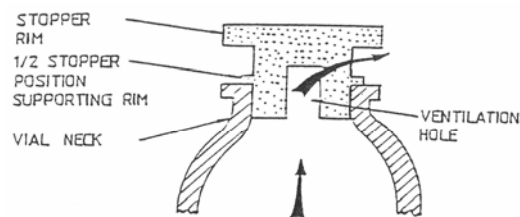
Baňka (B): Nástavec je vyroben z borosilikátového skla, ve spodní části je zúžení, které umožňuje spojení s baňkou. Nástavec má pravoúhlý tvar. Silikonový uzávěr ve tvaru kruhu umožňuje bezpečné propojení částí baněk během lyofilizace. Vrchní a spodní část baňky je vyrobena z borosilikátového skla. Baňka odolává vysokým teplotám a vysokému vakuu. Jsou dostupné v 7 velikostech [34]



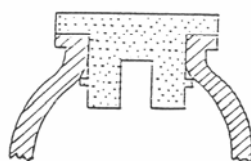
Obrázek 10. Baňky používané při sublimačním sušení

Baňky, které se vkládají do komory sublimační sušárny jsou zobrazeny na obrázku 11. Tyto nádoby bývají menších velikostí. Jsou opatřeny speciální ventilační zátkou, která umožňuje průnik par během sušení. Na konci procesu se zátky zasunou do baněk pomocí zátkovacího zařízení, které se nachází uvnitř komory. Zátka je vyrobena z eticky přijatelných polymerů. Bývá mazaná silikonovým olejem, který napomáhá vsunutí a vysunutí zátky do/z baňky.

Kvůli možné denaturaci produktu silikonovou kapalinou se zátky pokrývají alternativními mazivy jako je například teflon. Ampule jsou vyrobeny z kvalitního skla odolného vůči tepelným šokům, které nastávají během procesu sušení. Látky citlivé na světlo vyžadují baňky různě zbarvené [32].



A. STOPPER IN HALF WAY "FREEZE DRYING" POSITION.



Obrázek 11. Baňky používané při sublimačním sušení II. [32]

#### 2.4.4 Aplikace

Sublimační sušení patří mezi jedny z nejdražších sušících metod, přesto je jeho použití ve farmacii a v potravinářských aplikacích nenahraditelné.

##### *Zdravotní průmysl*

Nejrozšířenější použití lyofilizačních procesů zahrnuje zdravotnický průmysl. Sestává se z lyofilizace léčiv jako jsou chemické sloučeniny, matečné preparáty, bakteriální i virové vakcíny, antibiotika aj. V této kategorii jsou zahrnuty biotechnologické produkty, které jsou tvořeny zejména z proteinů [35].

##### *Veterinární odvětví*

Lyofilizované produkty ve veterinářství jsou v rozsahu od vakcín pro jednotlivá domácí zvířata po rozsáhlé aplikace, jako je očkování stád skotu, ovcí a hejna drůbeže. Tyto produkty slouží nejenom k ochraně zvířat, ale i k zlepšení kvality produktů z těchto zvířat [35].

##### *Potravinářský průmysl*

Nejnámějším sublimačně usušeným pokrmem je káva. Další lyofilizované produkty mohou být požívány buď jako aditivní látky nebo hotové produkty. Mezi aditiva patří např. vysušené plody v cereáliích a hotové produkty mohou být např. zmrzlina, které mohou být konzumovány bez potřeby další úpravy a je u nich eliminována potřeba chlazení. Dalším příkladem je lyofilizované hovězí maso. Požadovaných organoleptických vlastností dosáhneme přidáním vody a tepelným ošetřením produktu. S výjimkou speciálních případů, jako je například sublimačně usušená káva, v současné době lyofilizované jídlo nemůže ekonomicky soutěžit s mrazenými nebo konzervovanými potravinářskými produkty [35].

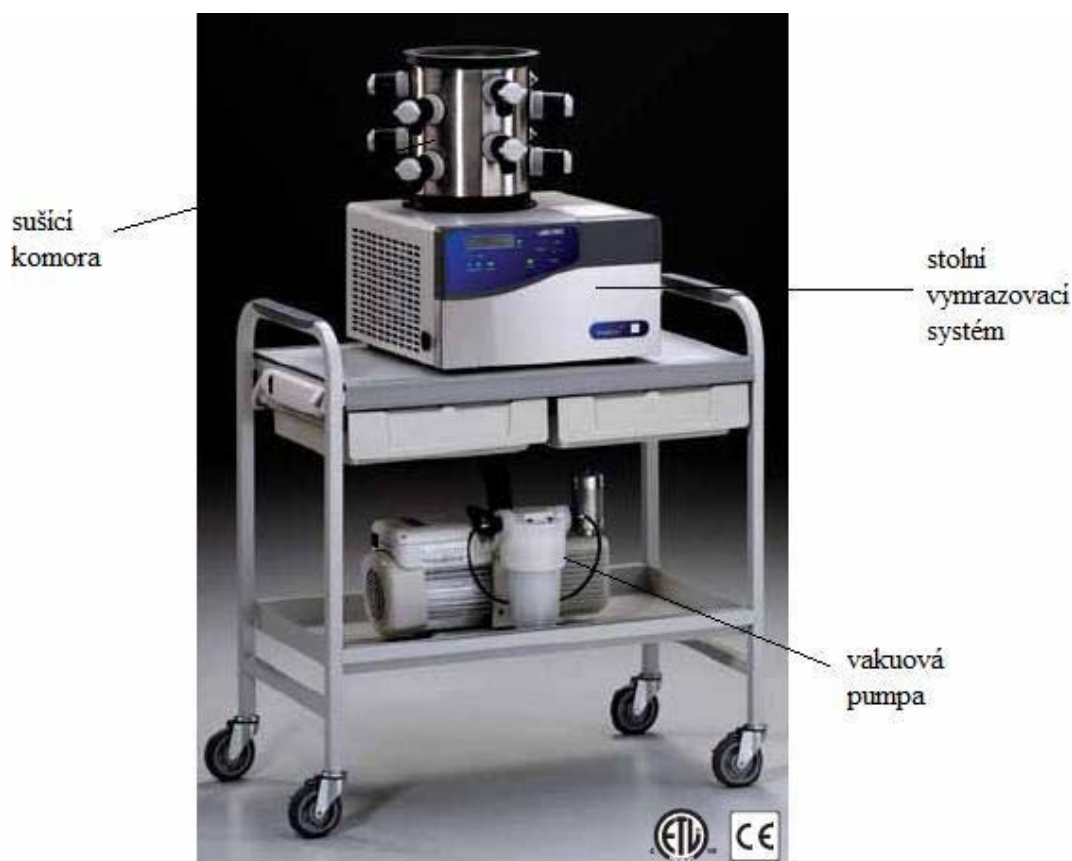
### ***Další aplikace***

Mezi další aplikace lyofilizace řadíme sušení květních materiálů a preparátů. Aplikace je limitována na květní části rostlin. Při procesu dochází k mírné změně v barvě. Například, červené růže inklinují k nabrání fialového odstínu. Stopky zase mají tendenci hnědnout. Listy se stávají křehkými a zkroucenými.

Při lyofilizaci rostlin hraje důležitou roli povaha rostliny. Například, kaktus je vybavený vnější membránou, aby udržel vodu. Membrána je téměř nepropustná pro vodní páry. Proto je potřeba u rostlin tohoto typu nejprve primárně narušit jejich vnější membránu a až poté je sublimačně usušit.

Sublimační sušení je také aplikováno na preparáty malých zvířat. Mnoho malých savců jako jsou veverka a mývalové jsou úspěšně lyofilizovány. Poskytují exempláře s živým vzhledem. Nicméně použití je pouze v omezené míře.

Lyofilizační proces je pomocnou metodou při záchraně rukopisných knih a dokumentů, které byly znehodnoceny vodou např. při záplavách. Rychlým zmrazením celého dokumentu a následným sublimačním sušením se obnovilo mnoho významných a hodnotných rukopisů [35].



*Obrázek 12. Sušící zařízení*

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Příprava rostlinného materiálu pro extrakci barviv

Vzorky hroznů byly odebrány na Jižní Moravě v oblasti Mikulova. Hrozny byly ustříženy nůžkami a ukládány do polystyrénového chladicího boxu na vrstvu suchého ledu. Po naplnění boxu byly hrozny zasypány ještě jednou vrstvou suchého ledu. Celkem byly odebrány dva vzorky hroznů: červená odrůda – Modrý Portugal a bílá odrůda – Rulandské šedé. Boxy byly uzavřeny a převezeny na FCH VUT v Brně, kde byly uloženy do hluboko mrazícího boxu s teplotou -75 °C.



Obrázek 13. Odběr vzorků hroznů

##### 3.1.1 Modrý Portugal

Mezi tradiční oblasti pěstování této odrůdy vína patří Rakousko, Čechy, Morava a Maďarsko. Keř je bujného růstu se středními, hladkými a světle zelenými listy. Hrozny jsou velké a středně husté. Středně velké bobule mají tenkou slupku modré barvy, řídkou dužinu a malý obsah cukrů i kyselin. Odrůda se sklízí od druhé poloviny září.

Mladé víno Modrého Portugalu má jemnou květinovou vůni. Použitím zvláštní technologie tzv. karbanické macerace přichází na trh víno pod názvem „Martinské víno“ v den svátku sv. Martina. Víno Portugalu se občas užívalo ke spojování s vínem Frankovky k dosažení rychlejšího zrání a zjemnění tvrdosti kyselin a tříslovin Frankovky. Takovou směs nazývali na Slovácku „Slovácký granát“. Barva vína je jemně rubínová. Ve vůni a chuti můžeme hledat květiny a čerstvé seno. Víno není vhodné k dlouhodobému skladování [36].



Obrázek 14. Modrý Portugal [36]

### 3.1.2 Rulandské šedé

Mezi tradiční oblasti pěstování této odrůdy vína patří Francie, Německo, Čechy, Morava a Maďarsko. Keř je středního růstu s málo dělenými, krabatými listy. Hrozny jsou malé, velmi husté s krátkými stopkami. Malé bobule mají tenkou slupku šedočervené barvy a sladké chuti. Odrůda se sklízí od poloviny října.

Od vín Rulandského šedého se očekává plnost, hebkost, vysoký extrakt a pomerančové tóny ve vůni. K dosažení těchto typických charakteristik je nutná vyzrállost alespoň na stupeň pozdního sběru. Poté se objevuje ve vínech vyšší obsah alkoholu a glycerolu. Jejich obsah je nutné při vinifikaci bedlivě hlídat. Stejně jako barevný tón vín, který může při nedostatečně rychlém zpracování šedomodrých hroznů vytvořit až růžový odstín. Výběry z hroznů a bobulí lze při dostatečném obsahu kyselin zařadit mezi bílá vína nejvyšší jakosti, a to za předpokladu dostatečně vysokého extraktu. Barva vína je zlatožlutá. Ve vůni a chuti můžeme hledat pomeranč, med, hrušky, mango a květiny. Víno je vhodné k dlouhodobému skladování [37].



Obrázek 15. Rulandské šedé [37]

### 3.2 Zpracování hroznů a jejich lyofilizace

Zmrzlé hrozny byly vloženy do polyetylenového vaku. Polyetylenový vak je opatřen dvěma malými otvory a jedním velkým, kudy byly do vaku vpraveny zmrzlé hrozny. Velký otvor byl zalepen izolační páskou a jedním z malých otvorů byl do vaku vháněn dusík po dobu asi 45 minut, aby byla zjištěna jeho dostatečná koncentrace ve vaku. Po uplynutí této doby byly i malé otvory zalepeny izolační páskou. Dusíkové prostředí je důležité pro zajištění stability barevných látek v hroznech. Vniknutím kyslíku do porušené slupky hroznů by došlo k oxidaci anthokyanů účinkem enzymů peroxidás a oxidás, které jsou přítomny v bobulích. Po rozmražení bobulí byla mechanicky odstraněna dužina od slupek. Slupky byly uloženy do mrazáku a postupně byly lyofilizovány. Sublimační sušení slupek probíhalo při tlaku 13,3 Pa a teplotě -45 °C. Takto usušené slupky byly uloženy do mrazáku a poslouží pro extrakci anthokyanových barviv, jejich separaci a identifikaci.



Obrázek 161. Zpracování hroznů

## 4 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo prostudovat odbornou literaturu, která se zabývá barvivy červených a bílých odrůd vína, v další části pak procesem lyofilizace. Experimentální část se věnuje úpravě bobulí vinné révy s následným sublimačním sušením slupek.

Úvod této bakalářské práce se věnuje vývoji a zrání bobulí a obecnému popisu jednotlivých částí hroznu resp. bobule. Je zde shrnuto zastoupení majoritních a minoritních látek v těchto částech rostliny. Zmíněno je i působení nežádoucích mikroorganismů na plody vinné révy a její chemické komponenty, tedy i barviva.

Asi největší pozornost byla věnována červeným barvivům. Anthokyany jsou specifickými barvivy řady rostlin, zejména červených hroznů a bezinek. Tato ve vodě rozpustná barviva jsou zajímavá svou stabilitou. Flavyliový červený kation je stálý pouze v kyselém pH, se vzrůstajícím pH dostává zbarvení fialové až modré tóny, vlivem vzniku modré chinoidalové báze. Anthokyany jsou látky citlivé na světlo a teplo a zejména na přítomnost vzdušného kyslíku. Snadno podléhají oxidaci a degradují. Mají významnou antioxidační aktivitu, která spočívá zejména v reakci s volnými radikály. Tím eliminují řadu onemocnění, například rakovinového původu. Jsou zde diskutovány i metody stanovení těchto barviv. Progres separačních technik pro anthokyany začal s tradiční papírovou, poté tenkovrstvou chromatografií a vzrůstal s pokročilými analytickými metodami k HPLC a CE kombinovanými s rozmanitými detektory jako jsou UV, MS nebo NMR. Anthokyanová barviva se řadí mezi přírodní, v potravinářství známé pod názvem E163. Používají se k barvení limonád, alkoholických nápojů, sladkostí, zmrzlin aj. Nesmějí se používat do potravin určených pro dětskou výživu. Nejsou známy žádné jejich nežádoucí účinky na lidský organismus. Nicméně jako všechna přírodní barviva jsou drahá a méně stála než barviva syntetická.

Barviva žlutá a zelená u bílých odrůd vína nejsou tak významná. Hrozny obsahují zejména chlorofyl a žlutá barviva např. lutein. V průběhu dozrávání hroznu se ale tyto látky ztrácejí až téměř vymizí. Tato barviva jsou stejně tak náchylná na vzdušný kyslík jako barviva červená. Chlorofyly se pro potravinářské účely získávají z listů špenátu nebo kopřivy a poznáme ho pod číslem E140. Je nestálý na světle a proto je jeho použití omezené.

Nakonec je popsán proces lyofilizace. Přednosti sublimačního sušení spočívají v následujících směrech: (a) při nízkých teplotách a tlaku jsou potlačeny chemické změny složek vzorku včetně jeho oxidace, (b) ztráty těkavých složek jsou výrazně sníženy, (c) možnost zachování sterility produktu. Vysušený materiál je disperzní, nedochází ke koagulaci jednotlivých složek produktu. Sublimační sušení je méně vhodné pro látky, které vytvářejí nepropustný povrch během chlazení, který inhibuje vývoj sublimačních par. A je nevhodné pro určité typy buněk (eukaryoty), které jsou schopné udržet svou životaschopnost. Sublimační sušení je významnou metodou dnes hojně užívanou v mnoha aplikacích, jak potravinářské, farmaceutické nebo jiném. Tato metoda byla použita při experimentální části k vysušení vzorku. Sušení bylo prováděno na přístroji FreeZone 4 od firmy Labconco. Vysušené vzorky byly skladovány v mrazáku a poslouží pro extrakci a stanovení barviv červených a bílých odrůd vína.

## 5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] MINÁRIK, Erich, NAVARA, Anton. *Chémia a mikrobiológia vína*. 1. vyd. Bratislava : Príroda, 1986. 547 s.
- [2] FARKAŠ, Ján. *Technologie a biochemie vína*. 2. vyd. Praha : Nakladatelství technické literatury (SNTL), 1980. 870 s.
- [3] MAZZA, G. Anthocyanins in grapes and grape products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1995, vol. 35, is. 4, p. 341-371.
- [4] CASTANEDA-OVANDO, Araceli, et al. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 2009, vol. 113, is. 4, p. 859-871.
- [5] WELCH, Cara R., WU, Qingli, SIMON, James E. Recent advances in anthocyanin analysis and characterization. *Current Analytical Chemistry*. 2008, vol. 4, is. 2, p. 75-101.
- [6] DA COSTA, Cristina T., HORTON, Derek, MARGOLIS, Sam A. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*. 2000, vol. 881, is. 1-2, p. 403-410.
- [7] BOULTON, Roger. The copigmentation of anthocyanins and its role in color of red wine: A critical review. *American journal of enology and viticulture*. 2001, vol. 52, is. 2, p. 67-87.
- [8] CLIFFORD, Michael N. Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000, vol. 80, is. 7, p. 1063-1072.
- [9] KOWALCZYK, Edward, et al. Anthocyanins in medicine. *Polish Journal of Pharmacology*. 2003, vol. 55, is. 5, s. 699-702.
- [10] SACCHI, Karna L., BISSON, Linda F., ADAMS, Douglas O. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American journal of enology and viticulture*. 2005, vol. 56, is. 3, s. 197-206.
- [11] BERENTE, Bálint, et al. Method development for the determination of anthocyanins in red wines by high-performance liquid chromatography and classification of German red wines by means of multivariate statistical methods. *Journal of Chromatography*. 2000, vol. 871, is. 1-2, p. 95-103.
- [12] TIMBERLAKE, CF., BRIDLE, P. Flavylum salts anthocyanidins and anthocyanins .2. reaction with sulphur dioxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1967, vol. 18, is. 10, p. 479-485.
- [13] TIMBERLAKE, CF., BRIDLE, P. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds and acetaldehyde and their significance in red wines. *American journal of enology and viticulture*. 1976, vol. 27, is. 3, p. 97-105.
- [14] BROUILLARD, R., DANGLES, O. Anthocyanin molecular interaction - the first step in the formation of new pigments during wine aging. *Food Chemistry*. 1994, vol. 51, is. 4, p. 365-371.
- [15] SOMERS, TC. Polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry*. 1971, vol. 10, is. 9, p. 2175-2186.
- [16] BARANOWSKI, ES., NAGEL, CW. Kinetics of malvidin-3-glucoside condensation in wine model systems. *Journal of food science*. 1983, vol. 48, is. 2, p. 419-429.

- [17] JURD, L. Review of polyphenol condensation reactions and their possible occurrence in aging of wines. *American journal of enology and viticulture*. 1969, vol. 20, is. 3, p. 191-195.
- [18] KANTZ, K., SINGLETON, VL. Isolation and determination of polymeric polyphenols using Sephadex LH-20 and analysis of grape tissue extracts. *American journal of enology and viticulture*. 1990, vol. 41, is. 3, p. 223-228.
- [19] Ústav zemědělské ekonomiky a informací [online]. 2009 [cit. 2009-03-16]. Dostupný z WWW: <<http://www.uzpi.cz/adresar/barviva.htm>>.
- [20] SIMA, Jan. Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích [online]. 2009 [cit. 2009-02-08]. Dostupný z WWW: <[http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka\\_chemie/vybranemet.htm](http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/vybranemet.htm)>.
- [21] Zemědělská fakulta Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích [online]. 2009 [cit. 2009-02-05]. Dostupný z WWW: <[http://www2.zf.jcu.cz/public/departments/lamb/new/kap\\_elfo\\_teorie.html](http://www2.zf.jcu.cz/public/departments/lamb/new/kap_elfo_teorie.html)>.
- [22] WALKER, Amada R., et al. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *Plant Journal*. 2007, vol. 49, is. 5, p. 772-785.
- [23] ORTEGA, Antonio F., MAYEN\*, Manuel, MEDINA, Manuel. Study of colour and phenolic compounds in two models of oxidative ageing for sherry type white wines. *Food Control*. 2007, no. 19, s. 8.
- [24] BONILLA, F., et al. Yeast used as fining treatment to correct browning in white wines. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2001, no. 49, p. 1928-1933.
- [25] CLARK, Andrew C. The production of yellow pigments from (+)-catechin and dihydroxyfumaric acid in a model wine system. *European food research and technology*. 2008, vol. 226, is. 4, p. 925-931.
- [26] LUTTER, Marcus, et al. Oxidation of caffeic acid in a wine-like medium: Production of dihydroxybenzaldehyde and its subsequent reactions with (+)-catechin. *Food Chemistry*. 2007, vol. 105, is. 3, p. 968-975.
- [27] LI, Hua. Mechanismus of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*. 2008, vol. 108, is. 1, p. 1-13.
- [28] Světvína.cz [online]. 2009 [cit. 2009-03-21]. Dostupný z WWW: <http://www.svetvina.cz/clanek.php?id=3>>.
- [29] HUBÁČEK, Vítězslav. *Výroba réвовého vína*. Praha : Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR, 1997. 40 s. ISBN 80-7105-140-3.
- [30] Fykologická laboratoř na Přírodovědecké fakultě JU v Českých Budějovicích [online]. 2003 [cit. 2009-03-26]. Dostupný z WWW: <[http://www.sinicearasy.cz/files/chlorofyl\\_a.gif](http://www.sinicearasy.cz/files/chlorofyl_a.gif)>.
- [31] HANIKA, Jiří.: *Speciální separační procesy*. 1. vyd. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. 77 s. ISBN 80-7080-242-1.
- [32] ADAMS, GDJ. Freeze-drying of biological materials. *Drying technology*. 1991, vol. 9, is. 4, p. 891-925.
- [33] JAFAR, Farid, FARID, Mohammed. Analysis of heat and mass transfer in freeze drying. *Drying technology*. 2003, vol. 21, is. 2, p. 249-263.
- [34] Labconco [online]. 2009 [cit. 2009-03-21]. Dostupný z WWW: <[http://www.labconco.com/product\\_lit/prodlit.asp?cat20id=42](http://www.labconco.com/product_lit/prodlit.asp?cat20id=42)>.
- [35] JENINGS, Thomas A. *Lyophilization: introduction and basic principles*. Boca Raton : CRC Press, 2002. 646 s. ISBN 1-57491-081-7.

- [36] *Znovín Znojmo a.s.* [online]. 2005 [cit. 2009-04-06]. Dostupný z WWW: <<http://www.znovin.cz/article.asp?nArticleID=289&nLanguageID=1>>.
- [37] *Znovín Znojmo a.s.* [online]. 2005 [cit. 2009-04-06]. Dostupný z WWW: <<http://www.znovin.cz/article.asp?nArticleID=273&nLanguageID=1>>.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

APCI	(atmospheric pressure chemical ionization) – chemická ionizace za atmosférického tlaku
CC	(column chromatography) – sloupcová chromatografie
CE	(capillary electrophoresis) – kapilární elektroforéza
CZE	(capillary zone electrophoresis) – zónová kapilární elektroforéza
ESI	(electrospray ionization) – ionizace elektrosprejem
FAB	(fast atom bombarded) – ionizace ostřelováním vzorků rychlými atomy
HPLC	(high-performance liquid chromatography) – vysoko-účinná kapalinová chromatografie
HPLC/MS	(high-performance liquid chromatography mass spektrometry) – vysokoúčinná kapalinová chromatografie – detektorem je hmotnostní spektrometr
HPLC/MS/ESI	(high-performance liquid chromatography mass spektrometry/electrospray ionization) – vysoko-účinná kapalinová chromatografie s ionizací atomů elektrosprejem a detektorem je hmotnostní spektrometr
HPLC/NMR	(high-performance liquid chromatography with nuclear magnetic resonance) – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem nukleární magnetické rezonance
HPLC/UV/Vis	(high-performance liquid chromatography with ultraviolet-visible spectroscopy) – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem ultrafialovo-viditelným spektrometrem
LLE	(liquid-liquid extraction) – kapalinová extrakce
MALDI	(matrix-assisted laser desorption/ionization) – desorpční fotoionizace
MPLC	(medium-performance liquid chromatography) – středo-účinná kapalinová chromatografie
MS	(mass spectrometry) – hmotnostní spektrometrie
NMR	(nuclear magnetic resonance) – nukleární magnetická rezonance
PC	(paper chromatography) – papírová chromatografie
PPO	(polyphenol oxidase) – polyfenoloxidas
RPC	(reverse phase chromatografie) – chromatografie s opačným sledem fází
SPE	(solid phase extraction) – extrakce na tuhou fázi
TLC	(thin layer chromatography) – chromatografie na tenké vrstvě
TOF	(time of flight) – průletový analyzátor