



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SLEDOVÁNÍ VLIVU KVASINEK NA CHEMICKÉ A SENZORICKÉ VLASTNOSTI VYRÁBĚNÉHO VÍNA

MONITORING OF THE INFLUENCE OF YEASTS ON THE CHEMICAL AND SENSORY QUALITIES OF
MANUFACTURED WINE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Ludmila Petrášová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Dana Vránová, Ph.D.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP1009/2015** Akademický rok: **2015/2016**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Bc. Ludmila Petrášová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)
Vedoucí práce **Mgr. Dana Vránová, Ph.D.**
Konzultanti:

Název diplomové práce:

Sledování vlivu kvasinek na chemické a sensorické vlastnosti vyráběného vína

Zadání diplomové práce:

1. Provedení literární rešerše na zadané téma
2. K identifikaci sensoricky aktivních látek využít metod GC
3. Ke sledování změn chemických parametrů vína využít spektrofotometrické metody i metody HPLC
4. K identifikaci kvasinek vyskytujících se v kvasícím moštu využít molekulárně biologických metod
5. Výsledky z experimentů zhodnotit formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Ludmila Petrášová
Student(ka)

Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá sledováním vlivu kvasinek na chemické a sensorické vlastnosti vyráběného vína. Cílem experimentální části bylo pomocí metody SPME-GC-MS identifikovat aromaticky aktivní látky v kvasicím moštu a víně odrůdy Hibernal a ve víně Rulandské bílé. U obou odrůd byla při výrobě využita autochtonní kvasinka izolovaná v naší laboratoři z povrchu bobulí odrůdy Hibernal. Bylo zjištěno, že obě vyráběná vína mají při použití naší kvasinky podobný aromatický profil. K dalším cílům patřilo sledování změn chemických parametrů u těchto vzorků s využitím spektrofotometrických metod a metod HPLC. Posledním cílem byla izolace a identifikace kvasinek z vína Rulandské bílé metodou PCR-RFLP a porovnání těchto kvasinek s kvasinkami izolovanými z moštu odrůdy Hibernal. Identifikace byla provedena amplifikací 5,8S-ITS úseků DNA pomocí primerů ITS1 a ITS4 a pro restriční analýzu byly využity restriční endonukleázy *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI* a *TaqI*^α.

ABSTRACT

The thesis deals with monitoring of the yeast's impact to the chemical and sensorial characteristics of produced wine. The aim of experimental part was obtaining of the aroma-active substances in the fermenting must and wine Hibernal and wine Pinot Blanc. SPME-GC-MS methods were used for identify wines and must aroma. The same autochthonous yeasts were used for wine production. This yeast was isolated from surface of grapes in our laboratory. It was found that both wines have a similar aromatic profile. The next aim was the monitoring of chemical parameters of samples and their changes. For this measurement were used spectrophotometric methods and HPLC methods. The last goal of the thesis was the isolation and identification of yeasts from wine Pinot Blanc by PCR-RFLP. These yeasts were then compared with yeasts isolated from Hibernal must. Identification of yeasts were done by amplification 5,8S-ITS DNA stretches using primers ITS1 and ITS4. Restriction endonuclease *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI* and *TaqI*^α. were used for restriction analysis then.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kvasinky, Hibernal, aromatické látky, SPME-GC-MS, HPLC, PCR, PCR-RFLP

KEYWORDS

Yeasts, Hibernal, flavoring substances, SPME-GC-MS, HPLC, PCR, PCR-RFLP

PETRÁŠOVÁ, L. *Sledování vlivu kvasinek na chemické a senzorické vlastnosti vyráběného vína*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 103 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Mgr. Daně Vránové, Ph.D. za odborné vedení práce, cenné rady a připomínky, za laskavost a vstřícnost a pomoc při psaní této diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Evě Vítové, Ph.D. za poskytnutí laboratoře pro měření a za pomoc při tomto měření. Dále Ing. Zuzaně Jurečkové za praktické rady a pomoc při práci.

Mé poděkování také patří vinařství Štěpána Maňáka za poskytnuté vzorky.

Obsah

1 ÚVOD.....	7
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Víno a réva vinná.....	8
2.2 Technologie výroby bílých vín.....	9
2.2.1 Kvašení.....	11
2.3 Kvasinky.....	13
2.3.1 Cytologie kvasinek.....	15
2.3.2 Vybrané rody kvasinek.....	17
2.4 Chemické složení hroznového moštu a vína.....	19
2.4.1 Voda.....	19
2.4.2 Sacharidy.....	19
2.4.3 Kyseliny.....	19
2.4.4 Minerální látky a vitaminy.....	20
2.4.5 Dusíkaté sloučeniny.....	21
2.4.6 Alkoholy.....	22
2.4.7 Acetaldehyd.....	22
2.4.8 Acetoin, 2,3-butandiol, diacetyl.....	23
2.4.9 Aromatické sloučeniny.....	23
2.4.10 Polyfenoly.....	26
2.5 Metody pro analýzu aromatických látek.....	27
2.5.1 Mikroextrakce tuhou fází.....	27
2.5.2 Plynová chromatografie (GC).....	29
2.6 HPLC s ELSD detektorem.....	30
2.6.1 ELSD.....	31
2.7 Polymerázová řetězová reakce.....	32
2.7.1 Průběh PCR.....	32
2.7.2 Komponenty pro PCR směs.....	33
2.7.3 Způsoby vyhodnocení PCR.....	35
2.7.4 Stanovení polymorfizmu délky restričních fragmentů u produktů PCR.....	36
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	37
3.1 Použité chemikálie, přístroje a pomůcky.....	37
3.1.1 Chemikálie.....	37
3.1.2 Plyny.....	38
3.1.3 Přístroje a pomůcky.....	38
3.1.4 Reálné vzorky vína.....	39
3.2 Identifikace aromaticky aktivních látek metodou GC.....	40
3.2.1 Podmínky SPME-GC-MS.....	40
3.2.2 Pracovní postup při analýze vzorků.....	40
3.3 Stanovení obsahu celkových polyfenolických látek.....	41
3.3.1 Princip metody.....	41
3.3.2 Příprava roztoků.....	41
3.3.3 Kalibrační křivka.....	41
3.3.4 Pracovní postup při měření vzorku.....	41
3.4 Stanovení celkových anthokyanových barviv.....	42
3.4.1 Princip metody.....	42
3.4.2 Příprava roztoků.....	42
3.4.3 Pracovní postup pro měření a stanovení celkových anthokyanových barviv.....	42
3.5 Stanovení celkové antioxidační aktivity.....	43

3.5.1 Princip metody	43
3.5.2 Příprava roztoků	43
3.5.3 Postup pro měření a stanovení celkové antioxidační aktivity	43
3.6 Enzymatické stanovení ethanolu	44
3.6.1 Princip metody	44
3.6.2 Příprava roztoků	44
3.6.3 Kalibrační křivka	44
3.6.4 Pracovní postup při měření vzorků	44
3.7 Stanovení sacharidů pomocí HPLC	45
3.7.1 Podmínky HPLC	45
3.7.2 Kalibrační křivka	45
3.7.3 Příprava vzorků	45
3.8 Stanovení kyselin pomocí HPLC	45
3.8.1 Podmínky HPLC	45
3.8.2 Kalibrační křivky	45
3.8.3 Příprava vzorků	46
3.9 Identifikace kvasinek vyskytujících se v moštu	46
3.9.1 Kultivační média a použité roztoky	46
3.9.2 Izolace čistých kultur kvasinek	48
3.9.3 Kochova zřed'ovací metoda	48
3.9.4 Izolace DNA	49
3.9.5 PCR	49
3.9.6 Elektroforetická detekce PCR produktů	50
3.9.7 Přečištění PCR produktů	50
3.9.8 Restrikční analýza	51
3.9.9 Zpracování výsledků v programu BioNumerics	51
4 Výsledky a diskuze	53
4.1 Identifikace aromaticky aktivních látek	53
4.1.1 Analýza reálných vzorků	53
4.1.2 Aromaticky aktivní látky identifikované ve vzorcích	53
4.2 Stanovení obsahu celkových polyfenolických látek	60
4.3 Stanovení celkových anthokyanových barviv	61
4.4 Stanovení celkové antioxidační aktivity	62
4.5 Enzymatické stanovení ethanolu	64
4.6 Stanovení sacharidů pomocí HPLC	66
4.7 Stanovení kyselin pomocí HPLC	68
4.8 Identifikace kvasinek v moštu	71
4.8.1 Kultivace kvasinkových kultur	72
4.8.2 Izolace DNA	72
4.8.3 Amplifikace DNA pomocí PCR	72
4.8.4 Restrikční analýza	72
4.8.5 Genetická podobnost kvasinek izolovaných z mladého vína odrůdy Rulandské bílé s kvasinkami izolovanými z moštů a vína odrůdy Hibernal	74
5 ZÁVĚR	76
6 LITERATURA	78
7 POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY	85
8 SEZNAM PŘÍLOH	86

1 ÚVOD

Víno je alkoholický nápoj, který vzniká kvašením moštu z hroznů révy vinné. Tato kulturní plodina rostla zřejmě už v období druhohor a nejstarší archeologické nálezy vína, které pochází z oblasti dnešního Íránu a Iráku, jsou asi 7000 let staré. Další nálezy pocházejí ze starověkého Egypta, Řecka a Říma. V Čechách a na Moravě se vinařství rozšířilo s příchodem Římanů asi ve 2. až 3. století a v současné době zaujímají plochy vinic v České republice téměř 18 000 ha. Vinohradnictví a vinařství patří v poslední době k oborům, které se velmi rychle rozvíjí. Spolu s tímto rozvojem roste také poptávka po kvalitním a originálním vínu, které bude mít žádané sensorické vlastnosti [1].

Na vzniku aromatických látek ve víně se velkou mírou podílejí kvasinky, které ovlivňují především sekundární aroma vína. K nejdůležitějším kvasinkám při výrobě vína patří kvasinky rodu *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia* a *Rhodotorula*. K identifikaci kvasinek se využívá celá řada biochemických i mikrobiologických metod. V poslední době se čím dál častěji využívají molekulární techniky například PCR, sekvenování, DNA-DNA hybridizace, RFLP chromosomální a mitochondriální DNA aj [2, 3].

Tato diplomová práce se zabývá identifikací aromatických látek v moštu a víně odrůdy Hibernál, který byl zaočkován autochtonní kvasinkou. Pro porovnání byly proměřeny i vzorky vína Rulandské bílé, které byly zaočkovány stejnou kvasinkou. Všechny tyto vzorky pocházely z vinařství Štěpána Maňáka ze Žádovic. Dále byly také pro srovnání změřeny vzorky vína Rulandské bílé, které pocházely od soukromého vinaře, který při výrobě tohoto vína využil spontánní kvašení. K identifikaci aromatických látek byla použita metoda mikroextrakce tuhou fází a plynová chromatografie s hmotnostní detekcí.

Dále se tato práce zabývá sledováním změn chemických parametrů, jako jsou polyfenoly, anthokyany, antioxidační aktivita, ethanol, kyseliny a sacharidy v moštu odrůdy Hibernál v průběhu kvasného procesu a ve víně odrůdy Rulandské bílé s využitím spektrofotometrických metod a metod HPLC.

V práci byla také pro izolaci a identifikaci kvasinek z vína odrůdy Rulandské bílé využita metoda stanovení polymorfismu délky restrikčních fragmentů u produktů PCR (RFLP-PCR). Při analýze DNA kvasinek byly využity primery ITS1 a ITS4, které amplifikují rDNA v oblasti 5,8S-ITS. Získané PCR produkty byly štěpeny pomocí restrikčních endonukleáz *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI* a *TaqI*^a. Získané fragmenty byly po elektroforetické vizualizaci zpracovány v programu BioNumerics.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Víno a réva vinná

Réva vinná (*Vitis vinifera*) je rostlina, která patří do čeledi révovitých. Dorůstá do výšky až 4 m a průměr kmene může dosáhnou 50 cm. Kořeny mohou dosáhnout délky přes 10 m. Plodem jsou bobule o průměru 0,4 - 1,5 cm [1].

Víno je produktem alkoholového kvašení moštu, který je vyroben z hroznů révy vinné (*Vitis vinifera*). Charakteristické vlastnosti vína jsou dány odrůdovými vlastnostmi révy vinné, také kvalitou hroznů použitých při výrobě, průběhem kvašení a zráním vína. Na jakost vína mají velký vliv i klimatické podmínky, hlavně slunečný a teplý podzim bez výrazných srážek. Důležitá je také poloha vinice, dostatek spodní vody a příznivé půdní podmínky [4].

Pro tuto práci byla zvolena odrůda Hibernal. Jedná se o bílou interspecifickou odrůdu vyšlechtěnou v Německu, která vznikla mezidruhovým křížením odrůd 7053 Seibel x Ryzlink rýnský klon 239 Gm - F2 generace. Je to pozdní odrůda odolná proti mrazu, která vyžaduje, aby se hrozny nechaly na keřích delší dobu. Hibernal dosahuje sklizňové zralosti asi v první polovině října. Odrůda je také odolná proti napadení houbovými chorobami. Roste na suchých stanovištích a keře této odrůdy bývají středního vzrůstu, středně až hustě olistněné. Hrozny jsou střední, volné až husté s malými kulatými bobulemi, které mají pevnou slupku šedorůžové barvy [5].

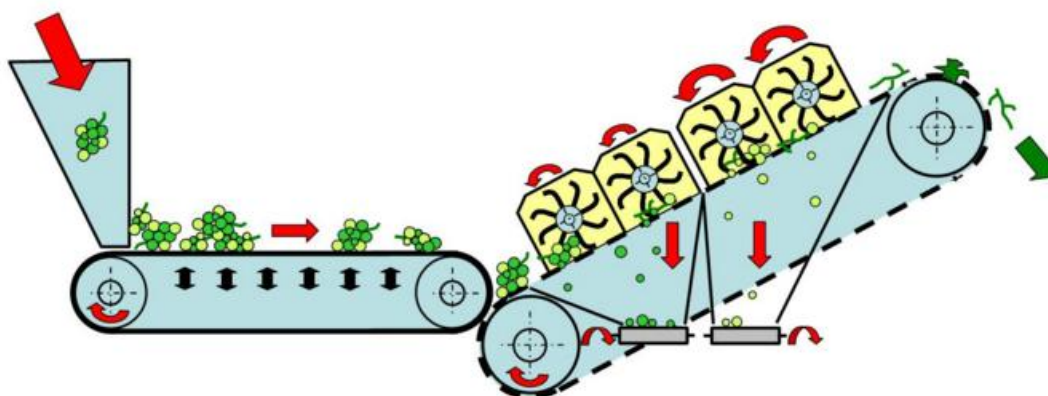
Vína této odrůdy jsou plná a kořenitě aromatická. Vyznačují se vonnými a chuťovými znaky připomínající grapefruit, jablko, meruňku, broskev a luční květy [6]. Používají se často k výrobě vín z pozdních sběrů a výběrů a také k výrobě biovín a barikových vín [5].



Obr. 2-1: Hibernál [7]

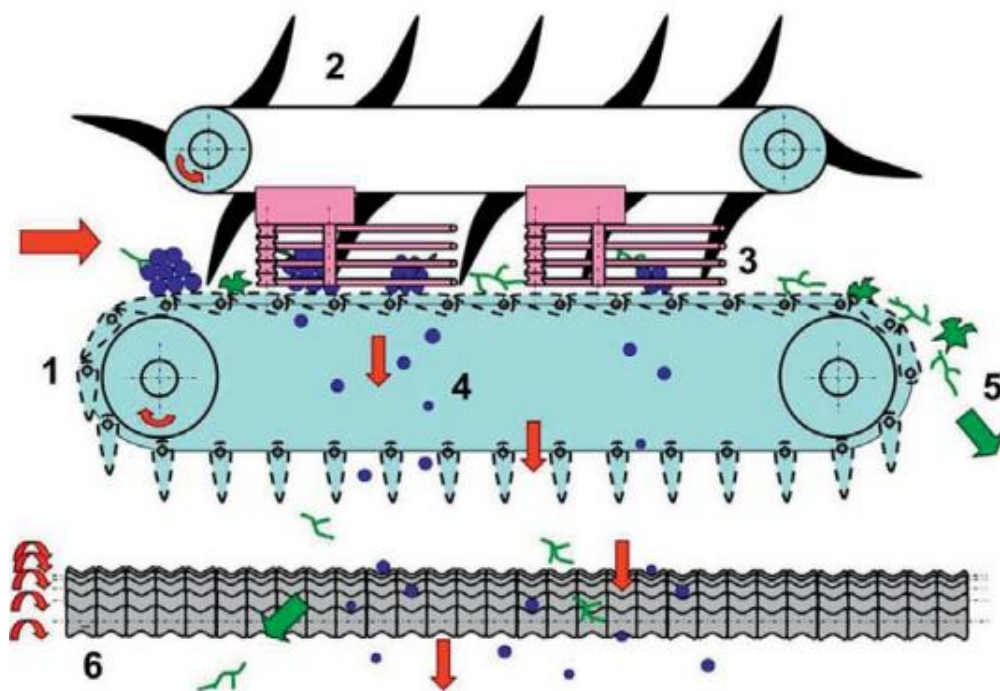
2.2 Technologie výroby bílých vín

Zdravé a kvalitní hrozny jsou sesbírány ručně nebo mechanicky a jsou převezeny na místo zpracování. Poté dochází v mlýnkoodzrňovači k odstopkování a k oddělení třapin od hroznů. Třapiny by mohly způsobovat nežádoucí travnaté chutě ve víně. V současné době se do provozu zavádějí nové typy separačních zařízení, které jsou schopny velmi šetrně oddělit bobule od třapin, aniž by došlo k mechanickému poškození bobulí. K takovýmto novým odstopkovacím zařízením patří například Euroselect vyrobený firmou Scharfenberg. Toto zařízení, jehož schéma je uvedeno na obr. 2-2, se skládá z vibračního dopravníku, na který navazuje síťový pásový dopravník. Nad tímto dopravníkem jsou umístěny dvojice rotorů, které jsou osázeny prstovými hvězdicemi. Velkým přínosem tohoto zařízení je, že dokáže vytřídit bobule v závislosti na stupni jejich vyzrálosti [8, 9].



Obr. 2-2: Schéma odstopkovacího zařízení Euroselect [9]

Dalším typem moderního odstopkovacího zařízení je SELECTIV PROCES WINERY, který byl vyroben firmou PELLENC. Toto zařízení, jehož schéma je uvedeno na obr. 2-3, je tvořeno dvěma částmi vibračního prutového ústrojí, které je umístěno nad roštovým dopravníkem. Mezi pruty kapkovitého tvaru jsou přiváděny dopravníkem sklizené hrozny. Pomocí vibrační prutové ústrojí odděluje jednotlivé bobule od třapin, bobule pak propadávají otvory v dopravníku na rošt, který je tvořený horizontálními souhlasně rotujícími hřídely. Na roštu jsou plastové segmenty, které tvoří mezery a umožňují propad bobulí na vynášecí pásový dopravník [9].



Obr. 2-3: Schéma odstopkovacího zařízení SELECTIV PROCESS WINERY (1-roštový dopravník, 2-vibrační sekce, 3-řemen s prsty, 4-aktivní rošt, 5-odvod příměsí z aktivního roštu, 6-odvod třápin a příměsí z roštového dopravníku) [9]

Po tomto kroku často následuje síření. Oxid siřičitý potlačuje růst bakterií a divokých kvasinek, zabraňuje oxidaci a utlumuje činnost oxidačních enzymů. Pro tento proces se může využít spalování sirných plátů, nebo aplikace disiřičitanu draselného, který se sype přímo na hrozny [8, 10].

Následným krokem je lisování, které přímo ovlivňuje kvalitu vína. Při tomto kroku dochází k oddělení moštu od vylisované slupky. Lisy se dělí na základě principu lisování na mechanické, hydraulické a pneumatické. V závislosti na dané odrůdě, ročníku, zralosti a způsobu lisování lze v průměru získat ze 100 kg hroznů 75 až 80 litrů moštu. V moderních provozech se v poslední době využívají nejčastěji lisy pneumatické, které jsou velmi šetrné k lisovaným produktům a snižují riziko uvolnění senzorycky nežádoucích látek [10, 11].

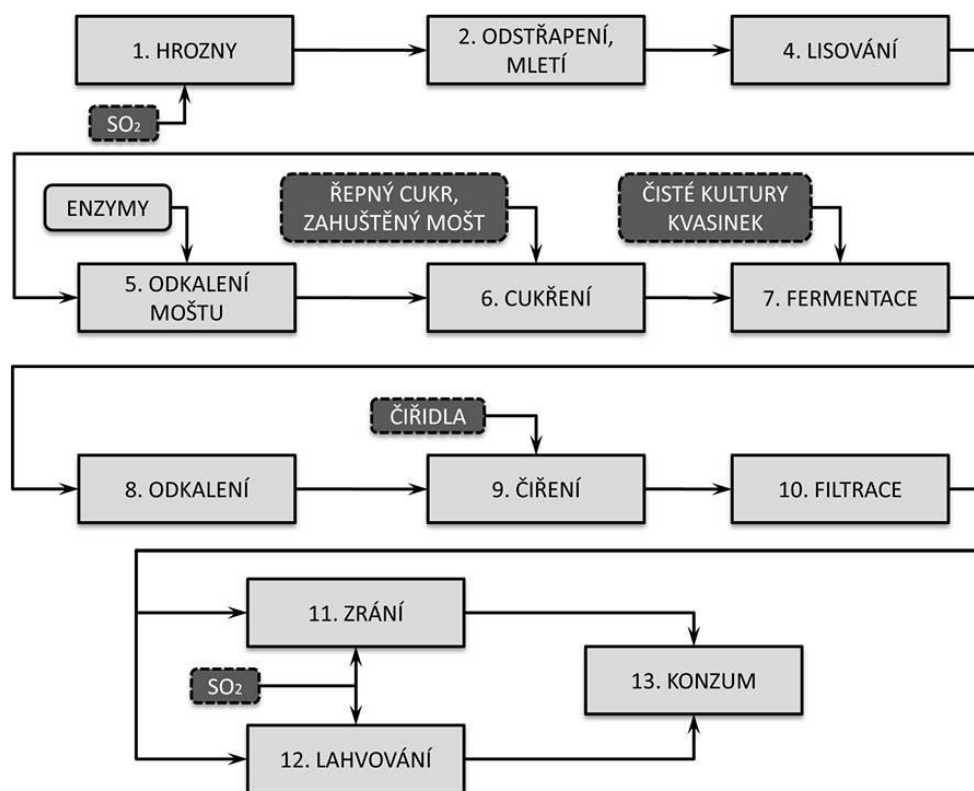
Odpadním produktem po lisování jsou vylisované slupky, které tvoří 25 % matoliny. K dalším složkám matoliny patří semena (8 %), stopky a úlomky třápin (10 %) a dřev bobulí (57 %). Matolína obsahuje dusík, fosfor, draslík a vápník v poměru 4:1:4:4 a obsahuje také velké množství organických kyselin. Množství matoliny závisí především na způsobu lisování. V průměru lze získat jednu tunu matoliny ze tří tun zpracovaných hroznů. V posledních letech se čím dál tím častěji uplatňují různé technologie zpracování matoliny. Patří k nim například výroba matolinového vína, výroba grappy, separace semen a jejich

lisování k získání oleje, výroba krmiv pro hospodářská zvířata, energetické využití matolin a výroba kompostu [9].

Vylisovaný mošt se musí zbavit zbytků semen, dužiny, třapin, nežádoucích mikroorganismů nebo zbytků ochranných přípravků. Využívá se k tomu diskontinuální nebo kontinuální odkalení. Při prvním způsobu dochází k sedimentaci kalů v nádobě a stočení čistého moštu. U kontinuálního odstředění se využívá odstředivá síla [10].

Před kvašením se musí ještě upravit cukernatost a obsah kyselin dle platné legislativy. Ve vinařské oblasti Čechy lze zvyšovat přirozený obsah alkoholu maximálně o 3 % obj., což odpovídá navýšení cukernatosti moštů a rmutů maximálně o 5 °NM a ve vinařské oblasti Morava lze zvyšovat přirozený obsah alkoholu maximálně o 2 % obj., což odpovídá navýšení cukernatosti moštů a rmutů maximálně o 3,4 °NM [12].

Následuje proces kvašení, který může probíhat buď spontánně nebo řízeně. Po kvašení následují metody školení a zrání vína, které zahrnují stáčení vína, čiření vína a filtraci vína [8].



Obr. 2-4: Schéma výroby vína

2.2.1 Kvašení

Alkoholová fermentace je nejdůležitější biochemický proces při výrobě vína. Tento proces se uskutečňuje pomocí vinných kvasinek, které přeměňují cukr v moštu na ethanol,

za vzniku oxidu uhličitého a tepla. Kvasinky během kvašení také produkují velké množství nových aromatických látek a také přeměňují aromatické prekurzory přítomné v moštu. K těmto vedlejším produktům patří například aceton, diacetyl, acetaldehyd, 2,3-butandiol, vyšší alkoholy, glycerol, estery, kyselina citronová, octová a jantarová, které jsou podrobně popsány v kapitole 1.4 [8].

Kvašení moštu může být zahájeno spontánně a nebo pomocí čistých kultur kvasinek při řízeném kvašení.

Spontánní kvašení

Pokud probíhá kvašení spontánně, do procesu se zapojují kvasinky, které se přirozeně vyskytují v moštu a také ve sklepech, kde probíhá kvasný proces. Spontánní kvašení zahajují takzvané apikulátní kvasinky, které jsou přirozenou součástí mikroflóry hroznů. K nejvýznamnějším apikulátním kvasinkám patří například rody *Candida*, *Hanseniaspora* a *Kloeckera apiculata*. Při postupném zvýšení koncentrace ethanolu je růst těchto kvasinek inhibován a ve fermentaci pokračují kvasinky rodu *Saccharomyces*. Výhodou tohoto způsobu je pozitivní vliv enzymů nesaccharomycetních kvasinek na aromatické vlastnosti vína. Víno si zachovává svůj odrůdový charakter [10].

Současné výzkumy se zabývají alternativami spojení výhod původní vinohradnické mikroflóry s výhodami při použití čistých kultur kvasinek. Takovým způsobem je také využití autochtonních kvasinek, což jsou kvasinky izolované z prostředí vinice, které jsou vyselektované, pomnožené a použité k zakvašení moštu. Také je zkoumáno využívání smíšených kultur kvasinek, například smíšené kultury *Saccharomyces cerevisiae* a *Kloeckera apiculata*. Úspěšně byla také použita apikulátní kvasinka *Hansenia vineae* jako inokulační startér při fermentaci. Takto vyrobená vína byla porovnávána s víny vyrobenými spontánním kvašením a s víny, u kterých byly využity komerční saccharomycetní kmeny. Vína vyrobená s využitím kvasinky *H. vineae* měla výraznější ovocný charakter, intenzivnější příchutě a plné tělo [13, 14, 15].

Řízené kvašení

Při řízeném kvašení se využívají čisté kultury kvasinek, které se komerčně získávají ve formě aktivních suchých vinných kvasinek. Tyto aktivní suché vinné kvasinky jsou speciálně vyšlechtěné čisté kultury kvasinek, které jsou přesně definované. Je známa jejich charakteristika i to, jaké sensoricky aktivní látky produkují. Jako startovací kultury se obvykle využívají kvasinky *S. cerevisiae*, po jejichž přidání je zajištěno dostatečné množství kvasinek už od začátku kvasného procesu. Kvašení s využitím těchto čistých kultur kvasinek je čisté,

rychlé a bez postraních tónů, ale velkou nevýhodou je, že vína vyrobená tímto způsobem mají užší aromatický profil, ztrácejí odrůdovost a často jsou uniformní [13].

2.3 Kvasinky

Kvasinky jsou nejvýznamnější složkou kvasného procesu. Jsou to jednobuněčné, heterotrofní, eukaryotní organismy, které se zařazují mezi houby. Mají sacharolytické schopnosti a často se proto vyskytují na surovinách obsahujících cukr. Tvar a velikost kvasinek může být různý. Závisí to na způsobu vegetativního rozmnožování, na kultivačních podmínkách a také na stáří buněk. Nejčastěji se vyskytuje tvar elipsoidní, vejčitý, kulovitý, některé rody mají tvar citrónovitý, trojúhelníkovitý nebo válcovitý [16]. Velikost buněk je v rozmezí 5-14 μm . Některé rody mohou vytvářet pseudomycélia s blastosporami a některé mohou tvořit pravé mycélium. Většina druhů kvasinek tvoří na kultivačních půdách bělavě zbarvené kolonie. Vyskytují se ale také červené nebo růžové kvasinky, například kolonie rodu *Rhodotorula*. Některé kvasinky tvoří také tmavě zbarvené až černé kolonie, například rod *Aureobasidium* [10, 17].

Kvasinky se na hroznu vyskytují nejvíce na povrchu slupky bobulí. Velkým zdrojem kvasinek je také půda. Z vinice se do moštu dostane jen asi 1 až 3 % požadovaných kvasinek, ale velké množství kvasinek se do moštu dostane ze sklepa, ve kterém probíhá zpracování hroznů a výroba vína. Jedná se o 16 druhů, z nichž ale jen 5 dokáže zcela prokvasit mošt. Rozmanitost kvasinek má velký vliv na sensorické vlastnosti vína. Kvasinky můžeme podle kvasného výkonu dělit na:

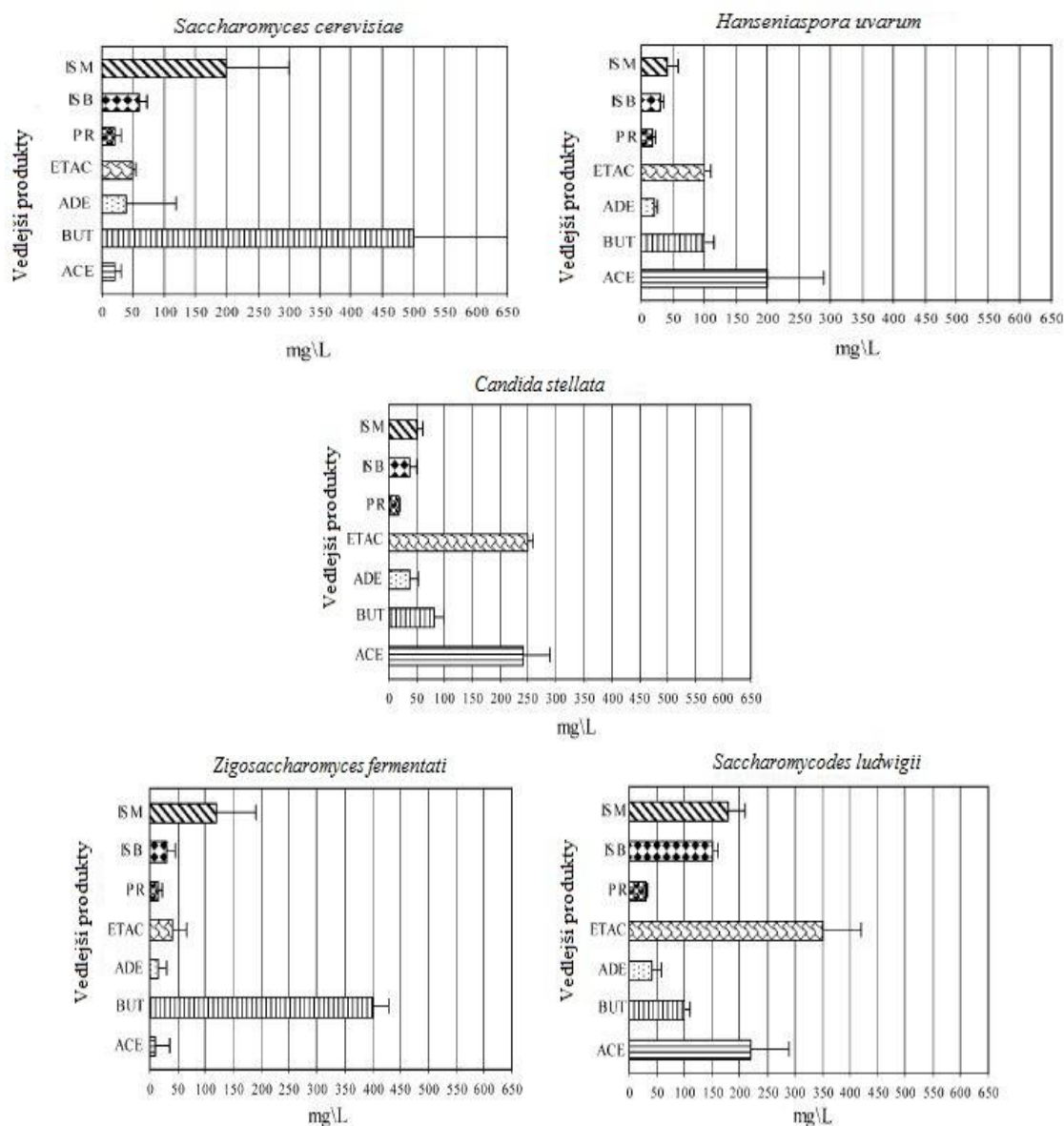
- slabě kvasící,
- velmi dobře kvasící,
- křísotvorné [10].

Slabě kvasící kvasinky se přirozeně vyskytují v moštu a označují se jako divoké kvasinky nebo také apikulátní kvasinky. Na začátku kvašení se vyskytují ve velkém množství a svou činnost končí při koncentraci ethanolu 5 až 6 %. Pak přebírají kvašení ušlechtilé kvasinky rodu *Saccharomyces*. Tyto typy kvasinek mohou růst za aerobních i anaerobních podmínek a podle těchto podmínek mohou vytvářet různé látky. K těmto látkám patří sekundární produkty jako jsou již výše zmíněné vyšší alkoholy, glycerol, estery kyselin a karbonylové sloučeniny. Tvorbou těchto produktů se slabě kvasící kvasinky značně podílejí na konečném buketu vína. Při nepříznivých podmínkách kvašení mohou ale produkovat

i zvýšené množství kyseliny octové, která může mít negativní vliv na aroma vína. Zástupci této skupiny jsou *Kloeckera apiculata*, *Candida* a druhy *Metchenikowia* [10, 13, 18].

Při zvyšující se koncentraci ethanolu přebírají hlavní roli v kvasném procesu velmi dobře kvasící kvasinky, ke kterým patří především ušlechtilé kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Tyto kvasinky tvoří velké množství alkoholu i žádané vedlejší produkty [10].

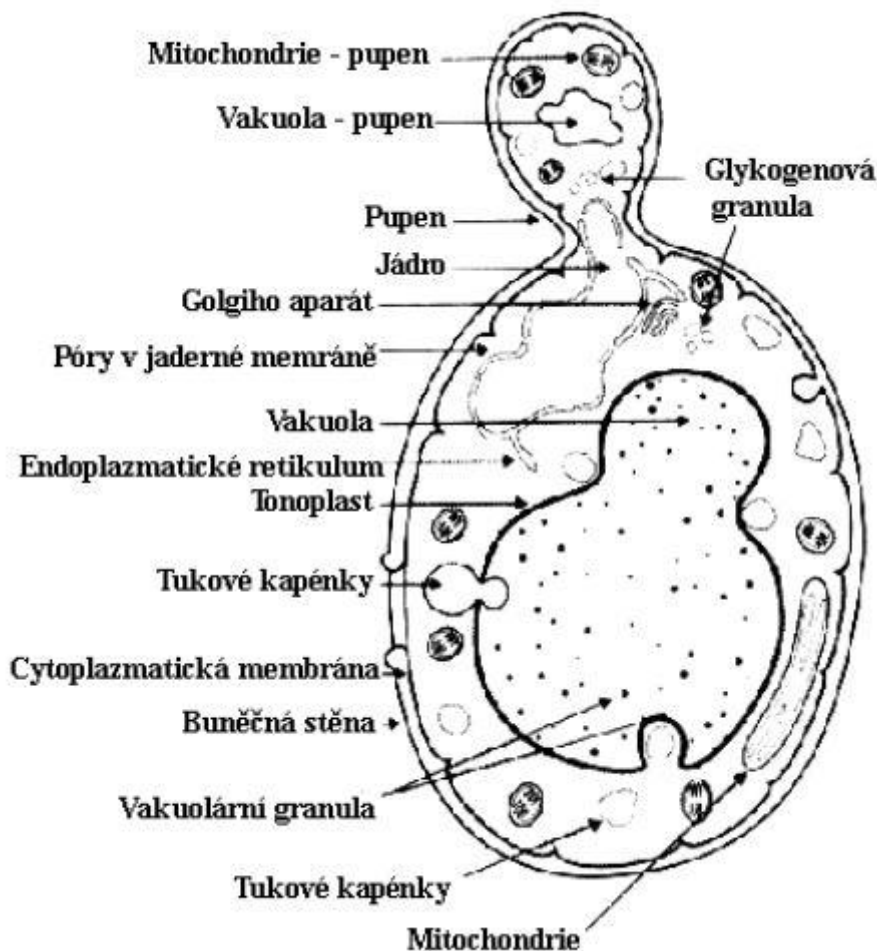
Přítomnost křísotvorných kvasinek je naopak nežádoucí, protože produkují sensoricky nepřijatelné produkty. Do této skupiny se řadí druhy *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea*, *Zygosaccharomyces* a *Saccharomycodes*. Křísotvorné kvasinky potřebují přístup kyslíku, a proto se vyskytují na hladině vín s nízkým obsahem alkoholu [10, 17].



Obr. 2-5: Aromatický profil charakterizující různé druhy kvasinek: ISM = isoamylalkohol; ISB = isobutanol; PR = n-propanol; ETAC = ethylacetát; ADE = acetaldehyd; BUT = 2,3-butandiol; ACE = acetoin [18]

2.3.1 Cytologie kvasinek

Buňka kvasinek se skládá z buněčné stěny, pod ní se nachází cytoplazmatická membrána, která uzavírá cytoplazmu s jádrem a dalšími organelami.



Obr. 2-6: Schéma buňky kvasinek [19]

Buněčná stěna

Na povrchu kvasinek je silná, pevná a poměrně elastická buněčná stěna. Tvoří 15-25 % suché hmotnosti buňky. Drží tvar buňky a chrání ji před mechanickým poškozením a před osmotickým šokem. Hlavní složkou buněčné stěny jsou glukany a mannoproteiny, u některých kvasinek ji tvoří i menší množství glukosaminu a chitinu. Glukan tvoří 60 % hmotnosti suché buněčné stěny a chemicky se dělí do tří kategorií:

- vláknitý β -1,3 glukan-je nerozpustný ve vodě, kyselině octové a alkáliích a jeho hlavní funkcí je zajištění tvaru a tuhosti buněčné stěny, je vždy připojen k chitinu,
- amorfní β -1,3 glukan-je nerozpustný ve vodě, ale rozpustný v alkáliích, dodává buněčné stěně pružnost a slouží k zakotvení mannoproteinů,

- β -1,6 glukán-je amorfni a rozpustný ve vodě, spojuje složky buněčné stěny dohromady a je místem pro receptor killer faktoru.

Mannoproteiny tvoří 25-50 % hmotnosti buněčné stěny. Chitin představuje 1-2 % buněčné stěny. V buněčné stěně se také může nacházet malé množství lipidů, fosfolipidů a fosforečnanů. Buněčnou stěnu tvoří 3 vrstvy. Vnější vrstvu tvoří mannoproteiny. Ty jsou připojeny k amorfni β -1,3 glukánu, který spolu s vláknitým β -1,3 glukánem tvoří vnitřní vrstvu. Vnitřní vrstva je připojena k malému množství chitinu. β -1,6 glukán působí jako cement mezi vrstvami [16, 22].

Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána tvoří asi 7 nm tenkou vrstvu sloužící jako osmotické rozhraní mezi buňkou a vnějším prostředím a je také sídlem transportních mechanismů. Je složena z lipidů a proteinů. U kvasinky *S. cerevisiae* obsahuje 40 % tuků a 50 % bílkovin. V malém množství jsou také přítomny glukany a mannany. K lipidům patří hlavně fosfolipidy a steroly. Ke třem hlavním fosfolipidům plazmatické membrány patří fosfatidylethanolamin, fosfatidylcholin a fosfatidylinositol. Hlavním steroidem plazmatické membrány je ergosterol. V menší míře se vyskytuje také 24(28) dehydroergosterol a zymosterol [22].

Cytosol

Cytosol tvoří vnitřní prostředí buňky. U mladých buněk je průhledný a homogenní, u starších se objevují zrníčka a vakuoly. Cytosol má pH mezi 5 a 6. Obsahuje rozpustné enzymy, glykogen a ribozomy. Probíhá zde velké množství biochemických reakcí, které jsou důležité při výrobě vína [16].

Endoplazmatické retikulum

Jedná se o systém dvojitých membrán napojených na jadernou membránu a zasahujících až k cytoplazmatické membráně. Membrány endoplazmatického retikula mají velké póry a na vnějším povrchu se nacházejí zrníčka polynomů s ribozomy, ve kterých se syntetizují bílkoviny. Tyto bílkoviny pak mohou zůstat ve vakuole, na plazmatické membráně, nebo mohou být vylučovány do vnějšího prostředí [22].

Mitochondrie

Mitochondrie jednotlivých buněk se mohou lišit svou velikostí i tvarem. Často jsou to kulovité nebo tyčové orgány obklopené dvojitou membránou. Vnější membrána má hladký povrch. Vnitřní membrána tvoří vychlípeniny (kristy) do mitochondrie. Jsou složeny hlavně z bílkovin, lipidů a fosfolipidů (fosfatidylcholin, fosfatidylglycerol

a fosfatidylethanolamin). Obsahují také četné steroly, proteiny a enzymy. Obsahují RNA a malé množství DNA, která slouží jako nositel mimojaderné dědičnosti. Hlavní funkce mitochondrií je, že jsou sídlem dýchacích enzymů a systému oxidační fosforylace [17].

Vakuola

Velikost vakuol se zvyšuje se stářím buňky. Má většinou kulovitý tvar a její průměrná velikost je 0,3 až 3 μm . Je obalena jednou membránou. Vakuoly slouží jako zásobník látek. Obsahují v sobě hydrolytické enzymy, polyfosfáty, draselné ionty, aminokyseliny, adenosin, kyselinu močovou a puriny [16].

Golgiho aparát

Jedná se o membránový aparát sloužící k transportu prekurzorů buněčné stěny z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu [22].

Jádro

Jádro kvasinek má kulovitý tvar, je umístěno ve středu buňky a je od cytoplazmy odděleno dvojitou jadernou membránou. Na povrchu membrány je mnoho pórů, které umožňují výměnu malých proteinů mezi jádrem a cytoplazmou. Velikost jádra je 1-2 μm . Rozlišení chromozomů v jádře kvasinek je obtížné. U kvasinky *S. cerevisiae* bylo zjištěno pomocí genetických studií 16 chromozomů v haploidním jádře. V jádře druhu *Saccharomyces cerevisiae* je také nízkomolekulární DNA délky 2 μm , která má kruhovou strukturu podobnou bakteriálním plazmidům a využívá se v genovém inženýrství. V jádru se nachází také jadérko, které má srpkovitý tvar a je uloženo těsně pod jadernou membránou [16, 22].

2.3.2 Vybrané rody kvasinek

Kvasinky se mohou rozmnožovat vegetativně pučením, nebo pohlavním způsobem tvorbou askospor nebo exospor. Podle způsobu sexuálního rozmnožování se kvasinky dělí na tři hlavní skupiny:

- rody tvořící askospory,
- bazidiomycetní kvasinky,
- rody u nichž není známa tvorba pohlavních spor [16].

K rodům kvasinek, které jsou důležité z potravinářského hlediska patří rod, *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces* a *Kloeckera*.

Rod *Saccharomyces*

Jedná se o nejznámější a nejprozkoumanější rod kvasinek. Rod *Saccharomyces* obsahuje 7 druhů. Tyto druhy zkvašují většinou více cukrů, jako zdroj uhlíku nevyužívají

laktózu a jako zdroj dusíku nevyužívají NO_3^- . Jejich tvar je většinou elipsoidní, vejčitý nebo protáhlý. Spájí se izogamně a askospory jsou uloženy po 1 - 4 v asku [16].

Nejdůležitějším druhem je *S. cerevisiae*. Jedná se o velmi rozšířenou kvasinku, která slouží jako modelový organismus. Vegetativně se rozmnožuje výhradně pučením. Buňky nejsou patogenní a mají oválný tvar. Na vhodné půdě tvoří kolonie bělavě krémové barvy, jsou vyvýšené, hladké, lesklé s kruhovitým nevláknitým okrajem. Vyznačuje se výraznými fermentačními schopnostmi. Zkvašuje glukózu, galaktózu, maltózu i sacharózu [17, 21].

Rod *Candida*

Rod *Candida* obsahuje 160 druhů. Patří sem kvasící i nekvasící druhy. *Candida utilis* se nejčastěji využívá k výrobě krmného droždí. Buňky mají oválný, vejčitý nebo cylindrický tvar. Kolonie jsou šedavě bílé, nízké a ploché. Uprostřed jsou mírně vyvýšené a okraje kolonií jsou kruhové nebo laločnaté. Druh *Candida boidinii* využívá jako zdroj uhlíku methanol, *Candida kefir* využívá laktózu a je imperfektním stádiem druhu *Kluyveromyces marxianus*. Do tohoto rodu patří ale i patogenní druhy, například *Candida albicans*, který je fakultativní patogen [16].

Rod *Pichia*

Rod *Pichia* tvoří protáhlé vegetativní buňky, které tvoří pseudomycelia. Vyznačuje se nízkými kvasnými schopnostmi a často tvoří kontaminaci vína nebo piva. Na povrchu tekutiny vytváří vzlínavou blanku, která se nazývá křís. Mezi tento rod se zařazují například druhy *Pichia farinosa* a *Pichia membranaefaciens* [17].

Rod *Kluyveromyces*

Rod *Kluyveromyces* se vyznačuje nepřítomností hexosové represe dýchání a vegetativní fáze je většinou haploidní. Kmeny tohoto rodu mají velkou metabolickou rozmanitost a vysoký stupeň vnitrodruhového polymorfismu. Tvoří bělavé kolonie s výrazně žlutohnědým nádechem uprostřed. Povrch mají hladký a lesklý, může být ale i bradavičnatý, matný a slizký. Mají značné biotechnologické využití, například výroba kefirů, sýrů s plísní, jsou schopny snižovat obsah laktózy a produkovat enzymy z aromatických sloučenin a ethanolu. Patří sem *Kluyveromyces marxianus*, který je součástí kefirových zrn [16, 17].

Rod *Kloeckera*

Rod *Kloeckera* se vyskytuje na nezralých hroznech nebo v půdě vinice. Kvasinky tohoto druhu snášejí velmi kyselé prostředí a zkvašují jen glukózu. Vyskytují se na povrchu hroznů a často zahajují fermentaci. Významným druhem je *Kloeckera apiculata*. Tvoří

kvasinky citrónovitého tvaru. Rozmnožuje se bipolárním pučením. Kolonie jsou krémově zbarvené, hladké a poměrně ploché [17].

2.4 Chemické složení hroznového moštu a vína

Obsah různých látek v moštu je ovlivněn počasím, vyzrálostí hroznů a také samotnou odrůdou. Složení moštu má poté vliv i na kvalitu vína, které se z něho vyrobí. Hlavními složkami moštu je voda, sacharidy, kyseliny, minerální látky, dusíkaté sloučeniny, polyfenoly a aromatické látky. Během kvašení dochází ke změně těchto látek, některé jsou zcela odstraněny a vznikají i nové sloučeniny [4].

2.4.1 Voda

Voda je hlavní složkou moštu. Její průměrná koncentrace je 780-850 g·dm⁻³. Působí jako rozpouštědlo chemických sloučenin [10].

2.4.2 Sacharidy

Sacharidy se vyskytují v moštu v koncentraci 120-250 g·dm⁻³. Zvyšují plnost, texturu a extrakt vína. Pro alkoholové kvašení jsou nejdůležitějšími cukry glukóza, fruktóza a sacharóza. Glukóza a fruktóza se nacházejí v moštu ve stejném poměru a jsou kvasinkami přeměněny na ethanol a oxid uhličitý. Glukóza je zkvašována jako první. Sacharóza je přítomna v bobulích jen v malém množství a před zkvašením musí nejdříve dojít k jejímu úplnému štěpení na glukózu a fruktózu. V moštu se také mohou vyskytovat pentózy, které ale kvasinky nezpracovávají a musí být stanoveny samostatně jako redukující cukry. Obsah cukru je základním kritériem klasifikace vín a odvíjí se od něj obsah alkoholu [8, 10].

2.4.3 Kyseliny

Koncentrace kyselin v moštu je 6-15 g·dm⁻³. Obsah organických kyselin patří k nejdůležitějším kvalitativním parametrům při výrobě vína a má významný vliv na barvu, chuť a stabilitu vína. Slouží také jako konzervační činidla. Dominantními kyselinami jsou kyselina vinná a kyselina jablečná. Představují 70-90% celkové kyselosti hroznů [10, 23].

Kyselina vinná

Je nejdůležitější kyselinou v moštu. Je dobře rozpustná ve vodě i v alkoholu. Je mikrobiálně i metabolicky stabilní. Koncentrace kyseliny zůstává relativně konstantní i během zrání bobule a zřejmě nesouvisí s klimatickými podmínkami. Z kyseliny vinné vzniká

spolu s chloridem draselným špatně rozpustný hydrogenvinan draselný. V této formě se vysráží asi 0,5 až 1,5 g·dm⁻³ kyseliny vinné [24].

Kyselina jablečná

Koncentrace kyseliny jablečné se během zrání zvyšuje od 1 g·dm⁻³ do 10 g·dm⁻³ a je závislá na klimatických podmínkách. Na obsah kyseliny jablečné má vliv také odrůda hroznů. Tato kyselina je transformována na kyselinu mléčnou během jablečno-mléčného kvašení a její vysoké koncentrace mohou mít negativní vliv na organoleptické vlastnosti vína. Kyselina jablečná může být také přeměněna kvasinkami na alkohol [24, 25].

Kyselina citronová

Je přítomna v moštu a ve víně v relativně nízkých koncentracích 50 až 300 mg·dm⁻³, ale má přímý vliv na organoleptické vlastnosti vína a je důležitá v řízení a rozvoji chuti během a po jablečno-mléčném kvašení. Během tohoto kvašení je přeměňována na diacetyl, který má máslovou chuť [10, 24].

Kyselina mléčná

Vzniká v malém množství při jablečno-mléčném kvašení z kyseliny jablečné a také kvasinkami z kyseliny pyrohroznové [10].

Kyselina octová

Primárně vzniká kyselina octová v aerobním prostředí oxidací ethanolu na kyselinu octovou. Tato kyselina může vznikat i za anaerobních podmínek činností kvasinek v množství 0,3 až 0,6 g·dm⁻³. Kyselina octová je hlavní těkavou kyselinou vína. Při pomalé fermentaci se zvyšuje metabolická aktivita kvasinek a množství této kyseliny může být vyšší. Pokud je přítomna ve vyšších koncentracích, projevuje se zápachem po octu a může přispět k nepříjemným pocitům v ústech [23, 25].

Další kyseliny

Ve víně se může v malém množství vyskytnout také kyselina jantarová, která vzniká odbouráním kyseliny jablečné kvasinkami a je také vedlejší produkt kvašení. Její obsah ve víně se pohybuje v koncentraci od 0,6 až 1,2 g·dm⁻³. Z dalších kyselin se ve víně v nízkých koncentracích vyskytuje kyselina glukonová, kyselina slizová a kyselina fumarová [23, 24].

2.4.4 Minerální látky a vitaminy

Minerální látky jsou v moštu přítomny v koncentraci 2,5-5 g·dm⁻³. Jejich množství je ovlivněno počasím, druhem půdy, hnojením, odrůdou a také vyžralostí hroznů.

K nejdůležitějším minerálním látkám patří draslík, který působí jako aktivátor enzymatických reakcí, ovlivňuje tvorbu organických kyselin a pH. Mezi další minerální látky patří hořčík, vápník, sodík, také fosforečnany, sírany, chloridy a uhličitany. V malém množství může mošt obsahovat také bór, křemík, mangan, zinek a železo. Minerální látky mají vliv na kvalitu moštu a vína. Jejich obsah se může snížit krystalizací, vysrážením nebo využitím kvasinkami [6, 8].

Vitaminy se účastní biochemických procesů. V největším množství je přítomen vitamin C, který působí jako antioxidant. Dále jsou zastoupeny vitaminy skupiny B, které využívají kvasinky během kvašení a jejich obsah se zvyšuje při autolýze kvasinek [10].

2.4.5 Dusíkaté sloučeniny

Dusíkaté sloučeniny jsou obsaženy v moštu v koncentraci $0,2-1,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Jejich obsah je závislý na intenzitě slunečního záření, množství srážek, teplotě, použité agrotechnice a také intenzitě hnojení révy dusíkem. Dusík se vyskytuje ve sloučeninách bílkovin, aminokyselin a amonných sloučenin. Tyto sloučeniny jsou až ze 75 % spotřebovány kvasinkami. Celkový obsah dusíkatých sloučenin v hotovém víně se pohybuje mezi $0,25$ až $4,50 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Ke zvýšené koncentraci dusíkatých sloučenin ve víně přispívá použitá výživa pro kvasinky a také autolýza kvasinek [5, 10, 26].

K dusíkatým sloučeninám vyskytujících se v moštu patří:

Aminokyseliny

Volné aminokyseliny jsou prekurzory aromatických sloučenin a mají velký vliv na výsledné aroma vína. Dusík v aminokyselinách je důležitý pro výživu kvasinek a jejich rozmnožování. Pokud je obsah dusíku ve formě aminokyselin nízký, může docházet k poruchám kvašení a mohou vznikat nežádoucí aromatické látky. K nejhojněji se vyskytujícím aminokyselinám patří prolin a arginin [23, 26].

Enzymy

Z bílkovin jsou důležité enzymy, které jsou biokatalyzátory chemických reakcí. V moštu se vyskytují pektinázy, které štěpí pektin a snižují viskozitu moštu. Dále se v moštu nachází oxidázy, které transportují kyslík, invertázy štěpící sacharózu na glukózu a fruktózu a glykosidázy, které štěpí glykosidické vazby a umožňují uvolnění aromatických látek do moštu a vína [10, 23].

Minerální dusík

V moštu se může dusík vyskytovat také ve formě iontů NH_4^+ . Dusík v této formě slouží také pro výživu kvasinek [8].

2.4.6 Alkoholy

Ethanol

Po vodě je ethanol druhou nejvíce zastoupenou složkou vína. Průměrný obsah ethanolu ve víně je 12,6 % objemových. Výjimečně může dosáhnout až 16 % objemových. Ethanol je ve víně produkován hlavně kvasinkami během alkoholické fermentace cukrů v moštu. Obsah ethanolu je důležitým kritériem jakosti. Má vliv na plnost vína a podporuje aroma ve víně [23].

Methanol

Methanol je zastoupen ve víně ve velmi malém množství mezi 30 a 35 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$. Netvoří se alkoholovým kvašením ale výhradně enzymatickou hydrolýzou methylových skupin pektinů. Nemá vliv na organoleptické vlastnosti vína [10].

Vyšší alkoholy

Některé vyšší alkoholy jsou produkovány během fermentace, vznikají jako odchylka v metabolismu aminokyselin. Dosahují koncentrace 150 až 550 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$. Často jsou pod limitem detekce, ale jsou prekurzorem esterů, které mají intenzivní vůně a hrají důležitou roli ve víně a přispívají k jeho složitosti. Patří sem například 2-methylpropan-1-ol (izobutanol), n-propanol, propan-2-ol (izopropanol), n-butanol, 3-methylbutanol, 2-methylbutanol, n-hexanol, 2-fenylethanol a n-amylalkohol [23].

Glycerol

Glycerol patří k důležitým primárním produktům alkoholového kvašení. Minimální koncentrace ve víně je 5 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ale může dosáhnout až 15-20 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Jeho obsah závisí na fermentačních podmínkách. Často je vytvářen divokými kvasinkami na začátku kvašení. Glycerol dodává vínu plnost a měkkost [23, 27].

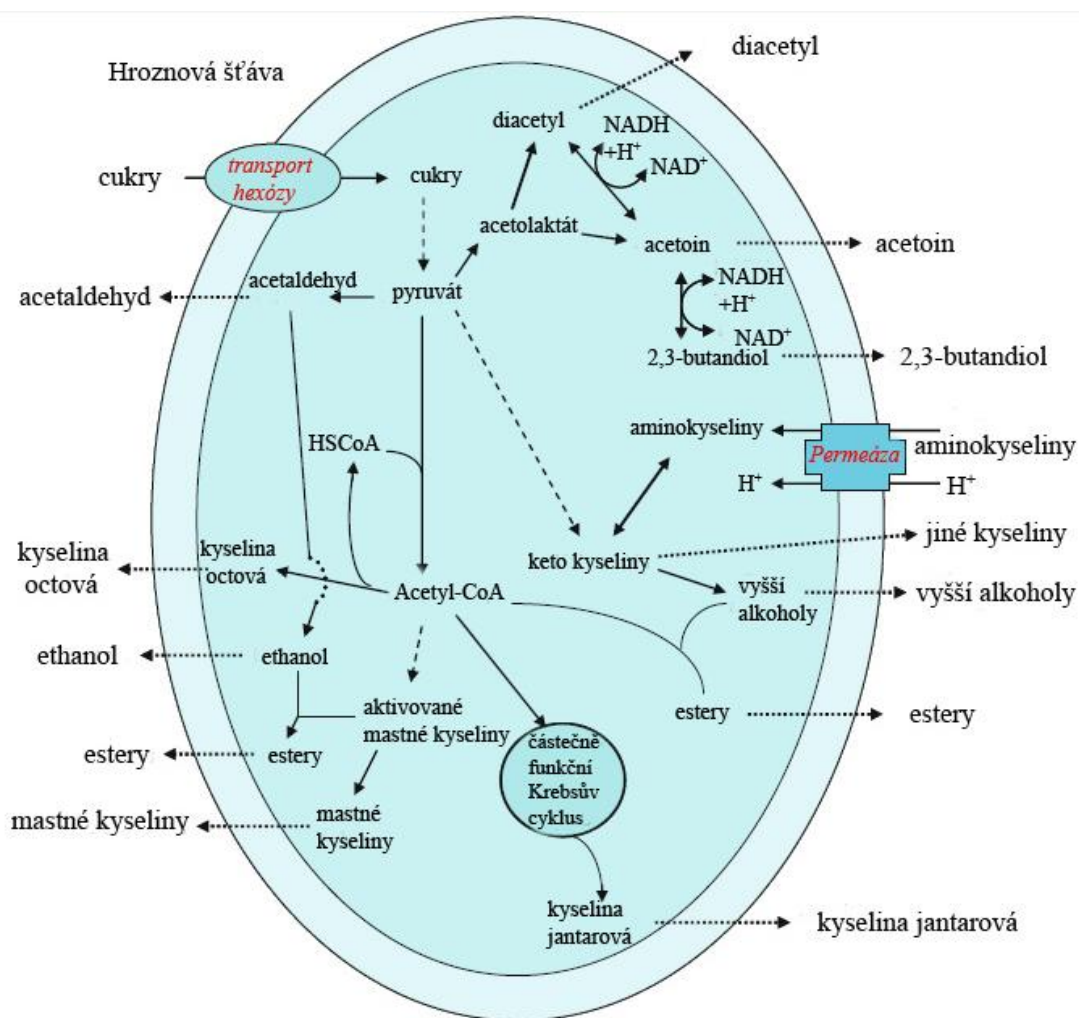
2.4.7 Acetaldehyd

Obsah acetaldehydu ve víně je 500 až 100 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$. Je meziproduktem alkoholového kvašení. Vzniká dekarboxylací pyruvátu. Ve velké míře je redukován na ethanol, ale malé množství může přecházet do vína. Acetaldehyd může vznikat také chemickou nebo

biologickou oxidací z ethanolu. Acetaldehyd se vyznačuje charakteristickou vůní, která může přispívat k dojmu, že je víno zoxidované [25].

2.4.8 Acetoin, 2,3-butandiol, diacetyl

Koncentrace acetoinu ve víně je kolem $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. 2,3-butandiol je obsažen v koncentraci 0,3 až $1,8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a souvisí s obsahem kvasinek. Diacetyl se vyskytuje v koncentracích 1,3 až $2,8 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, sensorický význam má při koncentraci 2 až $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Acetoin a diacetyl se vyznačují máslovým aroma. Látky vznikají kondenzací pyruvátu s acetaldehydem. Reakcí vzniká acetolaktát, ten je dále dekarboxylován. Při oxidační dekarboxylaci vzniká diacetyl, jinak vzniká acetoin. Ten vzniká i redukcí diacetylu. 2,3-butandiol vzniká redukcí acetoinu [4, 25].



Obr. 2-7: Metabolický původ vedlejších produktů alkoholového kvašení [25]

2.4.9 Aromatické sloučeniny

Aroma je jedním z hlavních charakteristik, které určují kvalitu vína. Celkové aroma vína je tvořeno vzájemným působením stovek různých vonných a chuťových látek. Těkavé

složky vína tvoří až 1000 sloučenin s širokým rozpětím koncentrace od několika miligramů až nanogramů a toto množství se u různých odrůd liší. Aroma vína je směs látek, které pocházejí z hroznů, vznikají jako vedlejší produkty kvašení a nebo při stárnutí vína. Podle toho rozeznáváme tři základní aromata, která vznikají v průběhu zrání a výroby vína [8].

Primární aroma je tvořeno látkami, které jsou přítomny přímo v bobulích hroznů. Dělí se na aromatické látky, které jsou typické pro danou odrůdu a dodávají vínu odrůdový charakter, a na aromatické prekurzory, které jsou také typické pro danou odrůdu, ale projeví se až po kvašení moštu. Toto aroma tvoří převážně osm až deset terpenových alkoholů, například geraniol ($0,3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, prahová koncentrace ve víně $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), nerol ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, prahová koncentrace ve víně $0,4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), linalool ($0,4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, prahová koncentrace ve víně $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), linalooloxid ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, prahová koncentrace ve víně $3\text{--}7 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) a α -terpinel ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, prahová koncentrace ve víně $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Tyto monoterpenové alkoholy se projevují sladkým, ovocným, květinovým až kořenitým aroma [8, 28].

Sekundární aroma vzniká činností kvasinek při alkoholovém kvašení a také při jablečno-mléčném kvašení ze sacharidů. Schopnost tvořit aroma závisí nejen na druhu kvasinek, ale i na konkrétním kmenu. Výběr kvasinkového kmene je proto kritický pro požadovaný styl vína. Tyto látky se projeví až po kvašení moštu v mladém víně. Jsou také charakteristické pro danou odrůdu. K důležitým látkám, které mají vliv na sekundární aroma patří vyšší alkoholy, které při nižších koncentracích zaokrouhlují výsledné aroma, ale při vyšších koncentracích mohou mít negativní vliv na celkové aroma. Často se vyskytují ve víně ve větším množství než odpovídá prahové koncentraci. Sekundární aroma je tvořeno také mastnými kyselinami, estery, aldehydy a ketony [10].

Terciální aroma způsobují chemické reakce, které probíhají až při procesu zrání vína. Důležitou chemickou reakcí jsou esterifikace, ve kterých reagují alkoholy a karboxylové kyseliny a vznikají estery [10].

K významným aromatickým látkám ve víně patří:

Sirné sloučeniny, zejména těkavé thioly

Tyto sloučeniny vykazují velmi výrazné aroma a jsou často příčinou organoleptických vad vína. Bylo také ale zjištěno, že některé typy thiolů dodávají vínu příjemné bylinné, ovocné, minerální nebo kouřové aroma. Často se také popisují jako aroma zeleného pepře, zimostáže, eukalyptu, černého rybízu, rebarbory, kopřivy, grapefruitu, ovoce, broskve, angreštu a také akátového dřeva. Ve starším víně se aroma rozvíjí a může připomínat vůni

pečeného masa a dokonce lanýžů. Thioly se uvolňují v průběhu macerace a během kvašení. Nejvíce těchto látek bylo identifikováno v hroznech odrůdy Sauvignon blanc. K identifikovaným látkám patří například 4-methyl-4-sulfanyl-pentan-2-on, vyskytující se v koncentraci jednotek až stovek $\text{ng} \cdot \text{dm}^{-3}$, 3-sulfanylhexylacetát o koncentraci nula až několik set $\text{ng} \cdot \text{dm}^{-3}$, 4-methyl-4-sulfanyl-pentan-2-ol, 3-sulfanylhexan-1-ol o koncentraci několika set $\text{ng} \cdot \text{dm}^{-3}$, a 3-methyl-3-sulfanylbutan-1-ol [25].

Estery

Estery ve víně patří k nejdůležitějším aromatickým látkám. Vznikají enzymatickou esterifikací během procesu fermentace, nebo chemickou esterifikací v průběhu dlouhodobého stárnutí z alkoholů a organických kyselin. Množství esterů je závislé na kmenu kvasinek. Při produkci esterů mají význam nesaccharomycetní kvasinky. Například ethylacetát je produkován převážně kvasinkami *Hansenula anomala*, *Candida crusei*, *Hanseniospora uvarum*, *Metschenikowia pulcherrima* a *Issatchenkia orientalis*. Významnou esterifikační činností se vyznačují také kvasinky kmene *Apiculatus*. K nejvýznamnějším esterům ve víně patří ethylacetát, jehož koncentrace přes 150 až 200 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ se může projevit nepříjemnými zápachy po lepidlu a octu. K dalším důležitým esterům patří izoamylacetát, izobutylacetát, hexylacetát, 2-fenylethylacetát, ethylbutanoát, ethylhexanoát, ethyloktanoát a ethyldekanoát. Tyto estery jsou charakteristické ovocným a květinovým aroma [25, 30].

Terpeny

V hroznech révy vinné bylo identifikováno asi 50 terpenových sloučenin. Nejvíce jsou zastoupeny monoterpeny. Ty se v menší míře vyskytují ve formě jednoduchých uhlovodíků, ale převážně ve formě terpenických alkoholů. K nejvýznamnějším sloučeninám patří linalool, geraniol, nerol, terpinol, citronelool, limonen a myrcen. Tyto látky mají převážně květinovou vůni a jejich čichové prahové hodnoty jsou velmi malé. Jejich obsah ve víně se liší v závislosti na odrůdě a může dosahovat koncentrace vyšší než 6 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ u intenzivně aromatických muškátových odrůd [23, 31].

Methoxypyraziny

Methoxypyraziny patří mezi významnou skupinu pyrazinů vyskytující se ve víně. Tyto látky vznikají jako sekundární produkty při přeměně a tvorbě aminokyselin a i přesto, že se vyskytují ve velmi nízkých koncentracích ($35 \cdot 10^{-3} \text{ ng} \cdot \text{kg}$, Sauvignon blanc), mají velký vliv při dotváření chuti i vůně u některých odrůd vína. Nejdominantnější sloučeninou je 2-methoxy-3-isobutylpyrazin, který se projevuje bylinným, travnatým, paprice podobným

aroma. Může také připomínat aroma zeleného pepře nebo chřestu a vyskytuje se převážně v odrůdách Sauvignon, Cabernet Sauvignon, Cabernet Moravia a Merlot [1, 25].

Norisoprenoidy

Norisoprenoidy vznikají oxidativní degradací karotenoidů. Nejvýraznější aromatické vlastnosti mají norisoprenoidy se 13 atomy uhlíku. Z chemického hlediska je můžeme dělit na megastigmány a non-megastigmány. Megastigmány jsou oxidované C13 norisoprenoidy. Do této skupiny patří β -ionon, jehož aroma připomíná fialky nebo maliny (práh vnímání ve vodě $7 \text{ ng} \cdot \text{dm}^{-3}$) a β -damascenon, který se projevuje květinovým a tropickým aroma (práh vnímání ve vodě $2\text{-}4 \text{ ng} \cdot \text{dm}^{-3}$). Dále se může ve víně vyskytovat 3-hydroxy- β -damascon a 3-oxo- α -ionol. Non-megastigmány neobsahují v bočním řetězci kyslík. K nejvýznamnějším zástupcům této skupiny se řadí 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaftalen (TDN). Tato látka se projevuje petrolejovým aroma a její práh vnímání je $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$. K dalším látkám vyskytujícím se ve víně patří vitispiran a actinodol, které mají vůni připomínající kafr a 4-(2,3,6-trimethylfenyl)buta-1,3-dien (TPB), jehož aroma připomíná při nízkých koncentracích posekanou trávu, ve vyšších koncentracích má spíše štiplavé až technologické vůně [23, 29].

2.4.10 Polyfenoly

Obsah fenolických látek závisí na odrůdě vína a je velký rozdíl ve složení fenolických látek mezi bílými a červenými víny a také mezi starými a mladými víny. Polyfenoly se nacházejí ve velkém množství v třapině, dužině, ve slupce bobulí a také v semenech. Odtud se pak dostávají i do vína. Obsah polyfenolických látek ve víně je ovlivněn použitou technologií při výrobě vína, například macerací rmutu, alkoholovou fermentací, oxidací, čiřením, filtrací a zráním. Fenolické látky mají vliv na antioxidační vlastnosti vína, hořkou a trpkou chuť, u červených vín odpovídají za barvu a u bílých vín se mohou podílet na oxidativním hnědnutí. K nejvíce zastoupeným fenolickým látkám ve víně patří fenolové kyseliny, flavonoly, flavan-3-oly, stilbeny a anthokyany [8, 23].

K fenolickým kyselinám obsažených ve víně patří především deriváty kyseliny skořicové a kyseliny benzoové. Obsah těchto kyseliny se u bílých vín pohybuje v rozmezí $10\text{-}15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, u červených vín $100\text{-}200 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Do této skupiny se řadí například kyselina p-kumarová, kyselina kávová, kyselina ferulová dále pak kyseliny p-hydroxybenzoová, kyselina vanilinová, kyselina gallová a kyselina salicylová [10, 33].

Flavonoly se ve víně často vyskytují ve formě glykosidů. K nejvíce zastoupeným flavonolům ve víně patří kvercetin, jehož koncentrace se v moravských vínech pohybuje v rozmezí $0,25\text{-}5,34 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, dále myricetin, rutin, kaemferol a isorhamnetin [34, 35].

Ze skupiny flavan-3-olů se ve víně vyskytuje v nejvyšších koncentracích katechin a epikatechin. Průměrná koncentrace katechinu v bílém víně je $28 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, v červeném víně $46 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. U epikatechinu se koncentrace u bílého vína pohybuje okolo $34 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ a u červeného vína okolo $33 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ [36].

Ze stilbenů je ve víně nejvíce zastoupen resveratrol. Koncentrace trans-resveratrolu se ve francouzských červených vínech pohybuje okolo $0,9$ až $3,8 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, u bílých vín do $0,2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. V moravských vínech ve velkopavlovické oblasti byl zjištěn obsah trans-resveratrolu až $7,8 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Cis-resveratrol vzniká na počátku kvašení a v průběhu dalšího kvašení jeho obsah klesá. Koncentrace cis-resveratrolu byla u červených francouzských vín naměřena okolo $0,9 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ [34, 36, 37].

Anthokyany jsou červená barviva hroznů. Nacházejí se převážně ve slupkách. Jejich množství je specifické pro různé odrůdy. Nejzastoupenější je malvidin. Jeho koncentrace je na počátku kvašení u červených vín na úrovni 100 až $1500 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ a po proběhlém kvašení a stárnutí vína dosahuje koncentrace $0-50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Dále se ve víně vyskytuje cyanidin, petunidin, peonidin a delphinidin [23].

2.5 Metody pro analýzu aromatických látek

K významným metodám stanovení aromatických látek patří dvoukroková analýza. Prvním krokem je mikroextrakce tuhou fází. Následuje plynová nebo kapalinová chromatografie. K nejpoužívanějším detektorům patří plamenově ionizační detektor a hmotnostní detektor.

2.5.1 Mikroextrakce tuhou fází

Metoda mikroextrakce tuhou fází (SPME) byla vyvinuta v roce 1989 J. Pawliszynem. Mikroextrakce tuhou fází je jednoduchá izolační metoda, která spojuje proces vzorkování a proces extrakce. Tato technika je moderní, účinná, dochází při ní k redukci organických rozpouštědel a podstatně je při ní zkrácena doba extrakce. Je také použitelná v širokém koncentračním rozsahu. Pořizovací a provozní náklady SPME jsou nízké. Nejčastěji se tato metoda využívá ve spojení s plynovou nebo kapalinovou chromatografií. Při použití vhodné detekční metody je metoda selektivní a citlivá. Metoda SPME se využívá pro stanovení kvalitativní i kvantitativní [38, 39].

Principem metody je expozice malého množství sorbentu nadbytkem vzorku. Analyty jsou sorbovány na vlákne, dokud není dosaženo rovnováhy. Zařízení pro vzorkování pomocí SPME se skládá z křemenného vlákna dlouhého 1 cm , které je umístěno uvnitř duté ocelové

jehly. Fotografie vlákna pořízená v laboratoři je na obrázku 2-8. Vlákno je pokryté různými typy stacionárních fází. Tyto stacionární fáze se mohou lišit polaritou i sorpčními vlastnostmi. Ocelová jehla chrání vlákno před mechanickým poškozením a slouží také k propíchnutí septa v zátce vialky. Jehla se zasune do vzorku, vlákno se vysune z jehly pomocí pístu a dochází k sorpci. Po dosažení sorpční rovnováhy se vlákno zasune pístem zpět dovnitř jehly a celá jehla se vytáhne ze zkumavky, vloží se do nástřikového prostoru chromatografu a vlákno se pístem opět vysune. Analyt se tepelně desorbuje a je unášen na GC kolonu [38, 40].

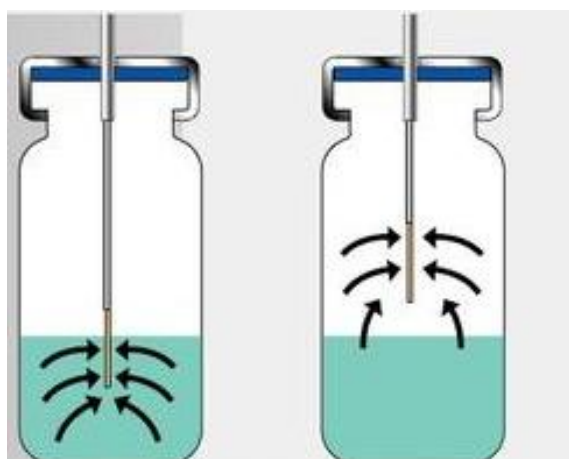
Metoda SPME je citlivá a je ovlivněna velkým množstvím faktorů, kterými jsou například polarita a tloušťka stacionární fáze, teplota vzorku, způsob vzorkování, míchání a objem vzorku, iontová síla roztoku a hodnota pH.



Obr. 2-8: SPME vlákno

Rozlišují se tři základní typy extrakce:

- extrakce přímá (Direct Immersing SPME, zkratka DI-SPME) - vlákno se přímo ponoří do vzorku, tato metoda je využívána především pro kapalné vzorky,
- extrakce headspace (Headspace SPME, zkratka HS-SPME) - dochází k extrakci analytů z prostoru nad vzorkem v uzavřené nádobě, metoda se využívá pro extrakci těkavých látek,
- membránově chráněná extrakce (Membrane protected mode) - extrakční fáze je od vzorku oddělena membránou [38, 39, 40].



Obr. 2-9: Schéma přímé SPME a headspace SPME [41]

2.5.2 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie je založena na rozdělení složek vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné heterogenní fáze, fází pohyblivou - mobilní a fází nepohyblivou - stacionární. Mobilní fází je nosný plyn. Stacionární fáze u náplňových kolon může být pevná látka nebo vysokovroucí kapalina nanesená na pevném inertním nosiči. U kapilárních kolon je stacionární fáze nanesená v tenké vrstvě přímo na stěnu kapiláry. Vzorek se nastříkuje do nástřikové komory, kde se odpaří a ve formě par je proudem plynu unášen na kolonu. V koloně pak dochází k rozdělení složek postupným zachytáváním na stacionární fází. Nejdříve kolonu opouští látky méně zachytávané. Složky, které opouští kolonu jsou detekovány na detektoru. Po vyhodnocení signálu z detektoru a z časového průběhu intenzity signálu se určí kvantitativní zastoupení a druh složek. Výsledkem grafického záznamu jsou chromatogramy [42, 43, 44].

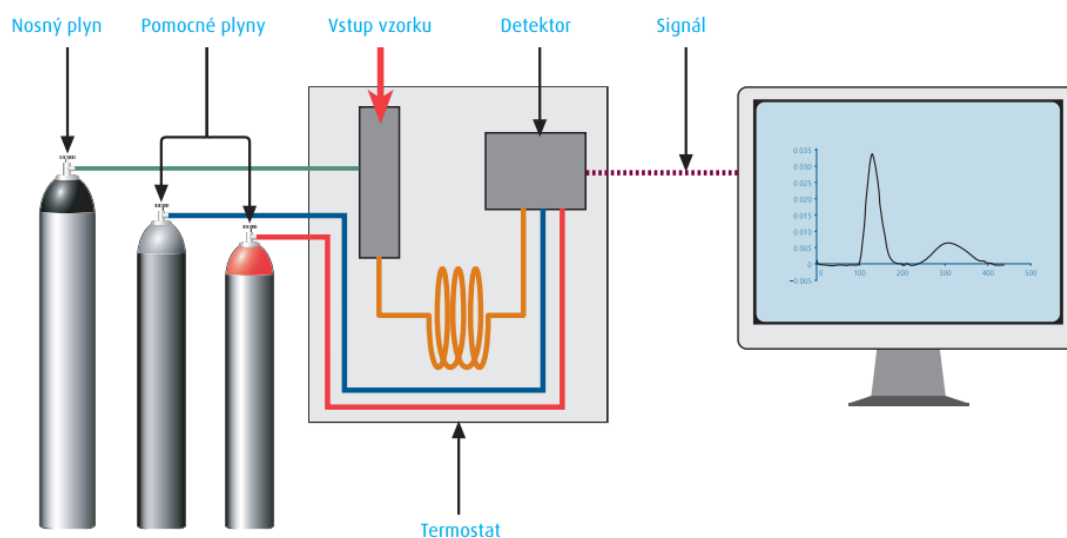
Plynová chromatografie je rychlá, citlivá, je potřeba malé množství vzorku a dochází při ní k účinné separaci látek. Nejčastěji se používá k analýze těkavých látek, plynů, nedisociovaných kapalin, pevných organických látek a organokovových sloučenin [42, 43, 44].



Obr. 2-10: Použitý GC/MS

Schéma plynového chromatografu je uvedeno na obr. 2-11. Plynový chromatograf se skládá z těchto částí:

- zdroj nosného plynu - tlaková láhev obsahující vodík, dusík, helium nebo argon,
- čistící zařízení - zachycuje vlhkost a nečistoty v nosném plynu,
- regulační systém - zajišťuje stálý nebo naprogramovaný průtok nosného plynu,
- dávkovací zařízení - slouží k zavedení vzorku do proudu nosného plynu, může se jednat o přímý nástřik do kolony, nástřik pomocí děliče toku a bezděličový nástřik,
- chromatografická kolona - obsahuje stacionární fázi a dochází v ní k separaci složek, může být náplňová nebo kapilární,
- termostat - zajišťuje dostatečně vysokou teplotu dávkovače, kolony i detektoru, zajišťuje izotermickou analýzu i analýzu s programovanou změnou teploty,
- detektor - slouží k detekci látek v nosném plynu, detektory v plynové chromatografii jsou tepelně-vodivostní, plamenově ionizační, detektor elektronového záchytu, fotoionizační, spojení plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC/MS), ve kterém jsou ionty analyzovány kvadrupólovým analyzátozem nebo iontovou pastí, pro každou složku směsi lze získat její hmotnostní spektrum, porovnat s knihovnou spekter a identifikovat ji,
- zařízení pro zpracování signálu detektoru a jeho záznam,
- zařízení na vyhodnocení analýzy [44].



Obr. 2-11: Schéma plynového chromatografu [45]

2.6 HPLC s ELSD detektorem

Pro kvalitativní i kvantitativní analýzu různých parametrů ve víně se využívá celá řada analytických metod. Široce využívané jsou chromatografické metody, které jsou účinné

a mají vysokou specifitu. K těmto metodám patří také vysoce účinná kapalinová chromatografie.

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) používá jako mobilní fázi kapalinu. Stacionární fáze obsahuje velmi malé částice pravidelného tvaru, které homogenně vyplňují kolonu a průtok mobilní fáze musí být proto pod vysokým tlakem.

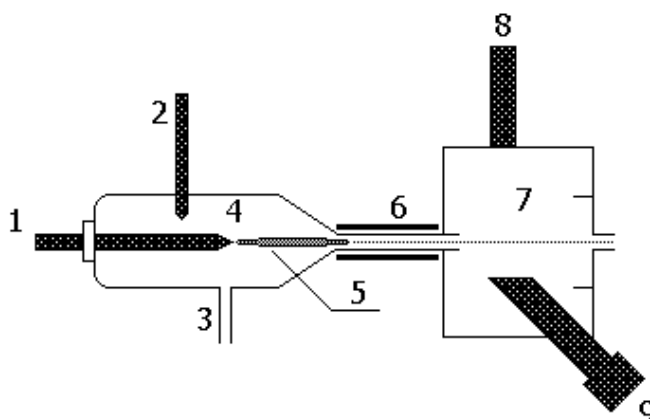
Tato metoda se využívá pro analýzu polárních i nepolárních látek, pro málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární látky. Výhodou je, že lze ovlivnit separaci složením mobilní fáze.

Jednotlivé části kapalinového chromatografu jsou:

- zásobníky mobilní fáze s odplyňovačem
- vysokotlaké čerpadlo
- dávkovací zařízení - nejčastěji se využívá šesticečný ventil s vyměnitelnou špičkou plněný injekční stříkačkou
- kolona - výhradně náplňová
- detektor - fotometrický, refraktometrický, fluorescenční, FTIR detektor, elektrochemické detektory, spojení s hmotnostní spektrometrií, ELSD [44].

2.6.1 ELSD

Evaporative Light Scattering HPLC Detector se využívá k detekci látek, které neobsahují chromofor ani fluorofor. Metoda se používá například k detekci sacharidů, fosfolipidů a aminokyselin. Detektor je univerzální, lze použít i pro gradientovou eluci a je destruktivní. Princip metody je založen na zaznamenávání rozptylu světla na částicích analytu, které vznikly při zmlžení eluentu a odpařením rozpouštědla [46, 47].



Obr. 2-12:ELSD detektor, 1-vstup eluentu, 2-vstup inertního plynu, 3-odpad eluentu, 4-zmlžovač, 5-zmlžený eluent se solutem, 6-evaporační komůrka, 7-optická komůrka, 8-zdroj záření, 9-fotodetektor [47].

2.7 Polymerázová řetězová reakce

Metody izolace a identifikace kvasinek procházejí v posledních letech výraznými změnami. Klasické biochemické a mikrobiologické metody jsou nahrazovány moderními molekulárními metodami, které jsou snadné a rychlé. Jednou z těchto metod je i metoda PCR-RFLP.

Polymerázová řetězová metoda (PCR) je metoda, díky níž je možno amplifikovat specifický úsek DNA in vitro. Umožňuje získat požadovanou a specifickou sekvenci DNA v mnoha identických kopiích.

Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směr 5'→3'. Tato syntéza je katalyzována DNA-polymerázou. Úsek nukleotidové sekvence vybraný k amplifikaci je vymezen připojením dvou primerů, které se navážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'-konce směřují proti sobě. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně [48].

2.7.1 Průběh PCR

Při PCR se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky. Prvním krokem je denaturace dvouřetězcových molekul, následujícím krokem je připojení primerů k odděleným řetězcům a posledním krokem je syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy.

- Denaturace dvouřetězcové DNA

Při denaturaci dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a vznikají dvě jednotlivá vlákna. Tento krok probíhá při teplotě 94 °C a trvá 20 až 30 sekund. V prvním cyklu bývá denaturace prodloužena, aby mohla proběhnout úplná a kompletní denaturace templátu.

- Annealing-připojení primerů

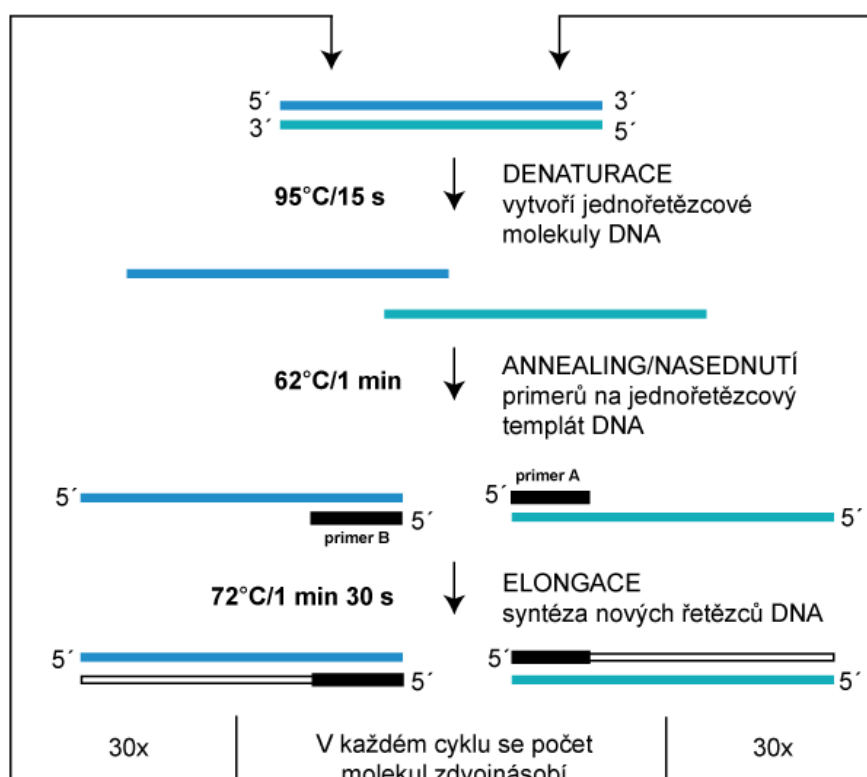
Při tomto kroku dochází k nasedání primerů na specifická místa oddělených řetězců templátové DNA. Děj probíhá po dobu 20 až 40 sekund při teplotě 50 až 60 °C. Teplota závisí na teplotě tání primerů. Pro vznik stabilních vodíkových můstků musí být sekvence komplementární s primery.

- Elongace-prodlužování primerů

Při elongaci dochází k přirůstání vlákna DNA, které je komplementární k původní molekule DNA, ve směru 5' konce ke 3' konci. Syntéza nových řetězců DNA je katalyzována DNA-polymerázou a teplota tohoto kroku proto závisí na použité DNA-polymeráze.

K nejčastěji využívaným patří Taq-polymeráza, která má optimální aktivitu při 75 až 80 °C. Při optimálních podmínkách je v každém kroku elongace množství DNA zdvojnásobeno. V posledním cyklu dochází k prodloužení syntézy na 5 až 15 minut, aby byl řetězec plně dosyntetizován a vyloučil se výskyt neúplných fragmentů [48, 49].

Tyto tři kroky se cyklicky opakují. Optimální počet cyklů se většinou pohybuje v rozmezí 25 až 35 cyklů a je závislý na výchozí koncentraci templátové DNA. Exponenciálně se syntetizuje až 10^9 kopií vybraného úseku DNA, který je definován primery. Výsledný produkt PCR se nazývá amplikon. Reakce probíhají v termocykléru, což je termostat ve kterém se automaticky mění teplota v naprogramovaných časových intervalech [49, 50].



Obr. 2-13: Schéma PCR [51]

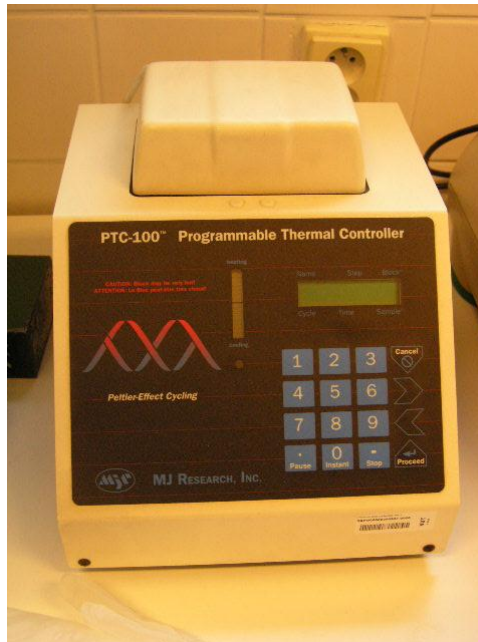
2.7.2 Komponenty pro PCR směs

Reakční směs pro polymerázovou řetězovou reakci o obvyklém objemu 25-100 µl se skládá z těchto komponent:

- PCR voda - redestilovaná voda se používá na doplnění PCR směsi na požadovaný objem.
- PCR pufr - je dodáván spolu s enzymem a zajišťuje optimální podmínky pro maximální aktivitu enzymu. Jeho důležitou složkou jsou ionty Mg^{2+} , které jsou

potřebné pro udržení enzymatické aktivity DNA-polymerázy. Dále pufr obsahuje tris-HCl a KCl.

- dNTP - 3'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty tvoří základní stavební kameny nově syntetizované DNA. Obvykle směs obsahuje ekvimolární množství každého nukleotidu o výsledné koncentraci 200 až 250 μM . Zvýšená koncentrace dNTP může inhibovat PCR.
- primery - jsou dva chemicky syntetizované oligonukleotidy složené obvykle z 18 až 24 nukleotidů. Musí být komplementární k templátové DNA určené k amplifikaci, měly by obsahovat stejné množství všech čtyř bází s rovnoměrným zastoupením cytosinu a guaninu, neměly by obsahovat sekundární strukturu a neměly by být vzájemně komplementární. Oba primery musí mít podobnou teplotu tání, která se obvykle pohybuje okolo 55 °C až 65 °C. Optimální koncentrace primerů ve směsi je v rozmezí 0,1 až 0,6 μM . Volbou správných primerů se určí specifita reakce.
- DNA polymeráza - katalyzuje syntézu nového řetězce DNA ve směru 5'→3' podle sekvence nukleotidů v komplementárním řetězci templátu DNA od místa navázání primeru. Na začátku cyklu dochází k denaturaci templátové DNA při teplotě 95 °C, proto se používají termostabilní polymerázy. K nejčastěji využívaným patří Taq-polymeráza izolována z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, který žije v horkých pramenech. Kromě této polymerázy se také používají Pwo a Pfu DNA-polymerázy, které jsou izolované z *Pyrococcus woesei* a *Pyrococcus furiosus*. Tyto enzymy mají polymerázovou aktivitu, ale také 3'→5' exonukleázovou aktivitu. Tyto polymerázy ale nejsou schopny syntetizovat dlouhé úseky DNA.
- templátová DNA - jedná se o úsek izolované DNA, který zahrnuje sekvenci vymezenou oběma primery. Touto DNA může být například fragment DNA, genomová DNA, rekombinantní plazmid, DNA bakteriofága, nebo jakýkoliv vzorek, který obsahuje DNA. Optimální koncentrace templátové DNA je u kvasinek 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ [48, 49, 52].



Obr. 2-14: Použitý termocyklér

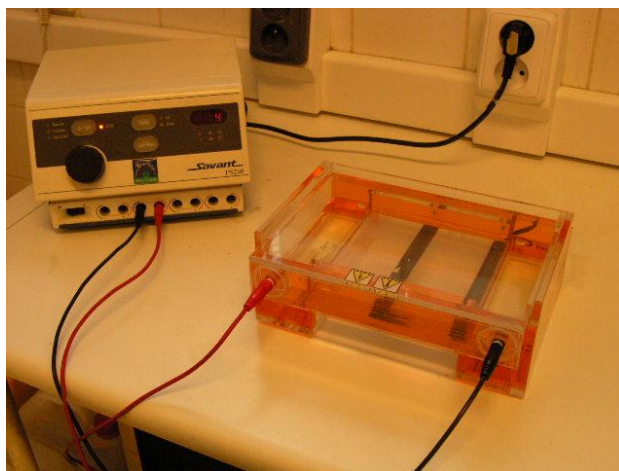
2.7.3 Způsoby vyhodnocení PCR

K častým způsobům identifikace a purifikace PCR produktů se využívá elektroforéza v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Gel je tvořen sítí polymerních molekul s póry. Principem této metody je migrace elektricky nabitých částic v elektrickém poli. Elektrické pole je tvořeno vložením konstantního elektrického napětí mezi elektrody. Jedná se o nedestruktivní metodu, kterou lze detekovat až 1 ng DNA.

Při přípravě gelu je důležité zvolit vhodnou hustotu, aby došlo k optimálnímu rozdělení fragmentů DNA. Pomocí hřebínku se při tuhnutí vytvoří jamky, do kterých jsou dávkovány produkty PCR. Po vložení napětí jsou produkty PCR děleny na základě své molekulové hmotnosti. Dochází k separaci ve směru procházejícího napětí od katody k anodě. Doba separace je 2 až 3 hodiny. Po separaci dochází k obarvení gelu nejčastěji ethidium bromidem, který se váže do struktury DNA. Po ozáření UV zářením o vlnové délce 260 až 360 nm červeno-oranžově fluoreskuje. Díky tomu je umožněna vizualizace a detekce výsledků gelové elektroforézy DNA. Velikost PCR produktů je porovnávána s DNA standardem (tzv. žebříčkem), který obsahuje fragmenty o známé velikosti. Standard se volí podle velikosti dělených fragmentů [44, 52].

K dalším způsobům vyhodnocení PCR patří například kvantitativní PCR v reálném čase, hybridizace na DNA-čipech, stanovení sekvence DNA, elektroforetická separace produktů za specifických podmínek pro detekci sekvenčních polymorfizmů denaturační gradientovou elektroforézou (DGGE), imobilizace PCR-produktů na membráně a tečková hybridizace se značenými alelově specifickými oligonukleotidy (ASO) nebo zpětná tečková

hybridizace s různými ASO imobilizovanými na membráně, hybridizace s neradioaktivně značenou sondou komplementární k části sekvence amplifikovaného úseku a detekce enzymoimunoanalýzou v mikrotitrační destičce (PCR-EIA/ELISA), analýza polymorfizmů konformace jednořetězcových forem (SSCP) a polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP) [48].



Obr. 2-15: Probíhající elektroforéza

2.7.4 Stanovení polymorfismu délky restrikčních fragmentů u produktů PCR

PCR-RFLP je modifikací standardní PCR. Tato metoda je používána k typizaci cílové sekvence genu, který obsahuje sekvenční polymorfismus. Při PCR-RFLP je určitá sekvence nukleové kyseliny amplifikována pomocí PCR a poté je vzniklý amplicon pomocí specifických enzymů nazývaných restrikční endonukleázy štěpen podle specifických sekvencí v restrikčních místech. Tato restrikční místa jsou poměrně krátká a obsahují 4 až 8 nukleotidových párů. Při štěpení DNA jedním enzymem vznikají v určité části molekul DNA při každé analýze stejné specifické fragmenty. Podle těchto fragmentů dochází k identifikaci daného mikroorganismu. Počet a délka fragmentů je pro daný organismus specifická. Fragmenty jsou vyhodnoceny pomocí gelové elektroforézy [48].

Používané restrikční endonukleázy jsou enzymy bakteriálního původu které jsou schopné štěpit dvouřetězcovou molekulu DNA hydrolýzou fosfodiesterových vazeb. V současné době je známo asi 1500 bakteriálních restrikčních endonukleáz. Jejich název se skládá z počátečního písmene rodového a prvních dvou písmen druhového jména mikroorganismu, ze kterého byly restrikční endonukleázy izolovány. Při identifikaci kvasinek se například využívá restrikční endonukleáza *HinfI*, která byla izolována z *Haemophilus influenzae* [52, 53].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části této diplomové práce bylo pomocí metody SPME-GC-MS identifikovat senzory aktivní látky přítomné ve vzorcích kvašeného moštu odrůdy Hibernál a ve víně odrůdy Rulandské bílé. K dalším cílům patřilo sledování změn chemických parametrů v moštu v průběhu kvasného procesu s využitím spektrofotometrických metod i metod HPLC. Posledním cílem byla identifikace kvasinek přítomných v moštu s využitím molekulárně biologické metody.

3.1 Použité chemikálie, přístroje a pomůcky

3.1.1 Chemikálie

- Agar, kvasniční extrakt (HiMedia Laboratories Limited Mumbai, Indie)
- Agaróza pro elektroforézu DNA EliPhore (Elizabeth Pharmacon s.r.o., ČR)
- ADH Sigma 7011-7,5 KU
- Délkový standard 100 bp (Elizabeth Pharmacon s.r.o., ČR)
- dNTP mix (Invitek, Německo)
- DPPH (Sigma-Aldrich, Německo)
- Ethidium bromid (Serva Bitech, Německo)
- Folin - Ciocalteuovo činidlo (Penta, ČR)
- Komerční sada Ultra CleanTM Microbial DNA Isolation Kit (Elizabeth Pharmacon spol.s.r.o., ČR)
- Kyselina gallová (Penta, ČR)
- Quant-iTTM ds DNA HS Assay Kit 0,2 – 100 ng
- *Taq* DNA polymerasa (Invitek, Německo)
- 10× *Taq* pufr pro PCR mix (Invitek, Německo)
- Primery ITS1, ITS4 (Invitek, Německo)
- Nanášecí pufr Loading buffer (Fermentas, Litva)
- Restrikční endonukleasy – *Hinf*I, *Hae*III (BioLabs, TaKaRa)
- Ethanol, methanol, EDTA, Tris, H₃BO₃, NaOH, CH₃COONa, HCl, Na₂CO₃
- Fruktóza, glukóza, sacharóza (Lachema a.s., ČR)
- Kyselina citronová, vinná, jablečná, jantarová, mléčná a octová (Lachema a.s., ČR)
- Parafinový olej
- Sladina (pivovar Brno)
- Sterilní a deionizovaná voda

3.1.2 Plyny

- Helium, čistota 4.8, v tlakové lahvi s redukčním ventilem (SIAD, Česká republika)

3.1.3 Přístroje a pomůcky

- Plynový chromatograf Trace™ 1310 se split/splitless injektorem (ThermoFisherScientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Hmotnostní detektor ISQ™ LT Single Quadrupole (ThermoFisherScientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Knihovna spekter NIST/EPA/NIH, Verze 2.0 (Gaithersburg, Maryland, USA)
- SPME vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30 µm, Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA
- HPLC Agilent Technologies 1200 Infinity Series
- HPLC Waters 2487
- Spektrofotometr Helios Delta (Spectronic Unicam, UK)
- pH metr
- Analytické váhy (A&D, Instruments LTD, Japonsko)
- Bakteriologické kličky
- Buničitá vata
- Bunsenův kahan
- Centrifuga Eppendorf 5430 R (Eppendorf AG, Německo)
- Elektroforetická vana Owl separation systeme, model B1, B2, D3 (Biotech s.r.o., ČR)
- Exsikátor
- Laboratorní sklo
- Lednice a mrazák k uchování vzorků DNA
- Mikropipety Biohit (Biotech s.r.o., ČR)
- Mikropipety pipet4u (AHN Biotechnologie GmbH, Německo)
- Mikrovlnná trouba ETA 1195 (ČR)
- Mikrozkumavky Eppendorf
- Minicentrifuga National LABNET C – 1200 (Biotech s.r.o., ČR)
- NanoPhotometer™ UV/Vis (Implen GmbH, Mnichov, Německo)
- Parafilm (American Nacional Can™, USA)
- PCR box AURA MINI (Bioair instruments, Itálie)
- Plastové Petriho misky
- Předvážky EK - 600 H (A&D, Instruments LTD, Japonsko)
- Sušárna (Binder, Německo)
- Sterilní box pro mikrobiologickou práci

- Termocyklér PTC - 100TM, (MJ Research, Inc, USA)
- Termostat IP 100 - U (LTE SCIENTIFIC, Velká Británie)
- Transluminátor (Ultra Lum. Inc, USA)
- Vortex LABNET VX 100 (Biotech s.r.o., ČR)
- Vortex-Genie 2, MO Bio (Biotech s.r.o., ČR)

3.1.4 Reálné vzorky vína

Pro analýzu aromatických a chemických látek byly použity vzorky moštů odrůdy Hibernál a vzorky mladého vína odrůdy Rulandské bílé. Oba mošty byly zakvašeny autochtonní kvasinkou, která byla izolována minulý rok z bobulí odrůdy Hibernál. Tyto vzorky poskytl vinařství Štěpána Maňáka ze Žádovic. Vzorky odrůdy Hibernál byly odebrány v průběhu kvasného procesu (HIB-0 až HIB-4), na počátku zrání vína (HIB-5) a po odležení vína na kvasinkách (HIB-6). Odběr HIB-0 je vzorek odebraný ještě před zakvašením autochtonní kvasinkou. Poté byl mošt přefiltrován a zaočkován autochtonní kvasinkou. Vzorky HIB-1 až HIB-4 jsou odebrány v průběhu kvasného procesu. U vzorku HIB-5 se jedná o mladé víno na počátku jeho zrání a vzorek HIB-6 je vzorek vína, které leželo na kvasinkách. Vzorek vína RB je mladé víno, které vzniklo také s využitím stejné autochtonní kvasinky. Pro porovnání aromatického profilu byl změřen i vzorek vína Rulandské bílé (RB-S), který pocházel od soukromého vinaře a vznikl spontánním kvašením. Po odebrání byly vzorky zmrazeny a uchovány v mrazicím boxu. Před každou analýzou byly vzorky rozmrazeny a ihned proměřeny. Tab. 3-1 udává seznam odběrů vzorků.

Pro izolaci a identifikaci kvasinek byly použity vzorky mladého vína Rulandské bílé (RB) z vinařství Štěpána Maňáka. Tyto kvasinky byly porovnány s kvasinkami identifikovanými ze vzorků odrůdy Hibernál. Tyto vzorky byly přefiltrovány přes bakteriologické filtry, které byly následně dány kultivovat na pevné médium do termostatu.

Tab. 3-1: Seznam odběrů moštu

Vzorek	Datum odběru
HIB-0	28.10.2015
HIB-1	2.11.2015
HIB-2	4.11.2015
HIB-3	6.11.2015
HIB-4	9.11.2015
HIB-5	23.11.2015
HIB-6	15.3.2016
RB	28.10.2015
RB-S	1.11.2015

3.2 Identifikace aromaticky aktivních látek metodou GC

3.2.1 Podmínky SPME-GC-MS

Podmínky SPME extrakce

- Doba inkubace: 10 min
- Doba extrakce: 20 min
- Teplota extrakce a inkubace: 40 °C
- Agitátor zapnutý 5 s, vypnutý 30 s
- Množství vzorku: 3 ml
- Hloubka ponoření vlákna do vialky: 20 mm

Podmínky GC-MS analýzy

- Kapilární kolona TG-WaxMS (30 m x 0,25 mm x 0,5 µm)
- Teplota injektoru: 240 °C
- Doba desorpce: 40 min
- Dávkování splitless, ventil uzavřen 10 min
- Hloubka ponoření vlákna do injektoru: 40 mm
- Nosný plyn - helium, průtok: 1 ml·min⁻¹
- Teplotní program: 40 °C s výdrží 2 min., vzestupný gradient 3 °C/min. do 130 °C s výdrží 0 min., vzestupný gradient 5 °C/min. do 200 °C s výdrží 0 min., celková doba analýzy 46 min.
- Hmotnostní detektor v modu EI, energie ionizačních elektronů 70 eV, teplota iontového zdroje 200 °C, skenovací rozsah m/z 300-370 amu, rychlost skenování 0,2 s

3.2.2 Pracovní postup při analýze vzorků

Do vialky byly odměřeny 3 ml vzorku moštu a vína, vialka byla uzavřena a ponechána inkubovat při teplotě 40 °C po dobu 10 min. Poté probíhala extrakce metodou SPME po dobu 20 min. Pak bylo vlákno přesunuto do injektoru plynového chromatografu a probíhala GC/MS analýza po dobu 40 min. Extrahované aromatické látky byly identifikovány porovnáním s knihovnou spekter a příslušnými standardy.

3.3 Stanovení obsahu celkových polyfenolických látek

3.3.1 Princip metody

Metoda je založena na reakci s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Při této reakci dochází ke změně barvy a tato změna je sledována spektrofotometricky při 750 nm. Výsledek je přepočítán na ekvivalent kyseliny gallové [54].

3.3.2 Příprava roztoků

7,5 % roztok uhličitanu sodného

Bylo naváženo 7,5 g Na_2CO_3 a navážka byla rozpuštěna v destilované vodě. Roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 100 ml a doplněn po rysku destilovanou vodou.

Zásobní roztok kyseliny gallové o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

Bylo naváženo 0,025 g kyseliny gallové a navážka byla rozpuštěna v destilované vodě. Roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněk po rysku destilovanou vodou.

3.3.3 Kalibrační křivka

Byly připraveny kalibrační standardy o koncentracích 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 a 200,0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Tyto standardy byly připraveny odměřením příslušného množství kyseliny gallové o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplněním baňek po rysku destilovanou vodou. Kalibrační roztoky byly připraveny do zkumavek napipetováním 0,1 ml Folin-Ciocalteuova činidla, 1,8 ml destilované vody a 0,1 ml jednotlivých kalibračních standardů. Zkumavky s kalibračními roztoky se promíchaly na vortexu a nechaly se 5 minut odstát. Poté k nim byl přidán 1 ml 7,5% roztoku Na_2CO_3 . Zkumavky byly opět promíchány na vortexu a nechaly se 2 hodiny reagovat. Byl připraven i slepý vzorek, u kterého byla místo vzorku použita voda. Po uplynutí reakční doby byla u kalibračních roztoků měřena absorbance proti slepému vzorku při vlnové délce 750 nm. Od každé koncentrace byly připraveny tři vzorky a každý vzorek byl proměřen třikrát. Z naměřených hodnot byly stanoveny průměry a z nich byla sestavena kalibrační křivka.

3.3.4 Pracovní postup při měření vzorku

Vzorky moštů byly přefiltrovány přes mikrofiltry a zředěny 1:1. Do zkumavek bylo napipetováno 0,1 ml Folin-Ciocalteuova činidla, 1,8 ml destilované vody a bylo přidáno

0,1 ml vzorku. Zkumavky byly promíchány na vortexu a nechaly se 5 minut odstát. Poté k nim byl přidán 1 ml 7,5% roztoku Na₂CO₃, směs byla opět promíchána a nechala se 2 hodiny reagovat. Pak byla měřena absorbance proti slepému vzorku při vlnové délce 750 nm. Každý vzorek byl připraven třikrát a každý z těchto tří vzorků byl stanoven také třikrát.

3.4 Stanovení celkových anthokyanových barviv

3.4.1 Princip metody

Tato pH diferenciální metoda je založena na tom, že při změně pH dochází k reverzní změně struktury anthokyanů. Tato změna se projevuje změnou zbarvení, které je možné stanovit spektrofotometricky. Měří se při 510 nm a 700 nm [54].

3.4.2 Příprava roztoků

0,025 M roztok chloridu sodného o pH 1

Bylo naváženo 1,86 g KCl a navážka byla rozpuštěna v 980 ml destilované vody. U takto připraveného roztoku bylo upraveno pH na hodnotu 1 pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplněn destilovanou vodou po rysku.

Acetátový pufr o pH 4,5

Bylo naváženo 54,43 g octanu sodného a navážka byla rozpuštěna v 960 ml destilované vody. U takto připraveného roztoku bylo upraveno pH na hodnotu 4,5 pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 1000 ml a byl doplněn po rysku destilovanou vodou.

3.4.3 Pracovní postup pro měření a stanovení celkových anthokyanových barviv

Pro každý vzorek bylo připraveno 6 zkumavek. Do zkumavek bylo napipetováno 0,5 ml vzorku. Do třech zkumavek od každého vzorku bylo přidáno 7,5 ml acetátového pufru o pH 4,5 a do třech zbývajících zkumavek od každého vzorku bylo přidáno 2,5 ml chloridového pufru o pH 1. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda. Všechny zkumavky byly promíchány na vortexu a ihned byla měřena absorbance při 510 nm a 700 nm. Každý takto připravený vzorek byl proměřen třikrát.

Z naměřených absorbancí byla výsledná absorbance A vypočítána podle vztahu (1):

$$A = (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH 1,0} - (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH 4,5} \quad (1)$$

Koncentrace monomerního pigmentu kyanidinu-3-glukosidu c_{MA} byla vypočítána podle vztahu (2):

$$c_{MA} = \frac{A \cdot Mr \cdot F \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l} [mg \cdot l^{-1}], \quad (2)$$

kde A je vypočítaná výsledná absorbance, Mr je molekulová hmotnost kyanidinu-3-glukosidu, F je faktor ředění, ε je molární absorpční koeficient a l je tloušťka kyvety.

3.5 Stanovení celkové antioxidační aktivity

3.5.1 Princip metody

Při reakci sloučenin, které mají antioxidační účinek, dochází k redukci syntetického radikálu DPPH (2,2-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Tato redukce se projeví změnou barvy vzorku, kterou měříme spektrofotometricky při 517 nm [54].

3.5.2 Příprava roztoků

Roztok DPPH

Bylo naváženo 0,0015 g DPPH. Navážka byla rozpuštěna v methanolu a kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněna methanolem po rysku.

3.5.3 Postup pro měření a stanovení celkové antioxidační aktivity

Vzorky moštu byly nejprve zředěny methanolem 1:2. Poté bylo do kyvety napipetováno 1,5 ml zředěného vzorku a 1,5 ml roztoku DPPH. Ihned po smíchání byla kyveta vložena do spektrofotometru a byla odečítána absorbance v čase 0 sekund a pak každých 10 sekund po dobu 6 minut při vlnové délce 517 nm. Jako slepý vzorek byl použit methanol. Každý vzorek moštu byl proměřen třikrát. Byla také změřena absorbance směsi složené z 1,5 ml methanolu a 1,5 ml roztoku DPPH, která byla nutná k výpočtu zhášecí aktivity.

Z naměřených hodnot absorbancí byl sestrojen graf závislosti poklesu absorbance na čase a byla vypočítána zhášecí aktivita podle vztahu (3):

$$DPPH[\%] = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \cdot 100, \quad (3)$$

kde A_0 je absorbance směsi methanol a DPPH, A_1 je absorbance vzorku, ve kterém je přítomen antioxidant.

3.6 Enzymatické stanovení ethanolu

3.6.1 Princip metody

Stanovení je založeno na oxidaci alkoholu alkoholdehydrogenasou (ADH). Množství alkoholu ve vzorku je úměrné vzrůstu absorbance při přeměně NAD^+ na NADH.

3.6.2 Příprava roztoků

0,1 M Tris-pufř o pH 10,0

Bylo naváženo 3,03 g Tris(hydroxymethyl)amin a navážka byla rozpuštěna v 200 ml destilované vody. pH roztoku bylo pomocí HCl upraveno na 10,0 a roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 250 ml a doplněn po rysku destilovanou vodou.

ADH Sigma 7011-7,5 KU

Bylo naváženo 10 mg pevného proteinu a navážka byla rozpuštěna v 500 μl Tris-pufřu. Protein byl rozdělen po 70 μl do mikrozkušavek a byl zamražen.

Reakční směs

Bylo naváženo 40 mg NAD^+ a navážka byla rozpuštěna v 60 ml Tris-pufřu. Reakční směs byla rozdělena do zkumavek po 3,5 ml a byla zamražena. Před stanovením byla reakční směs temperována na 20 °C.

3.6.3 Kalibrační křivka

Byly připraveny kalibrační standardy ethanolu o koncentracích 0,0025; 0,005; 0,01; 0,02 a 0,04 %obj. Kalibrační roztoky byly připraveny do kyvety napipetováním 500 μl reakční směsi, 10 μl příslušného standardu a 10 μl suspenze ADH. Obsah kyvety byl promíchán a po ukončení reakce (asi 10 minut) byla odečtena absorbance při 340 nm proti slepému vzorku. Slepý vzorek byl připraven do kyvety napipetováním 500 μl reakční směsi, 10 μl vody a 10 μl suspenze ADH. Každý kalibrační standard byl připraven třikrát a každý vzorek byl také proměřen třikrát.

3.6.4 Pracovní postup při měření vzorků

Každý vzorek byl dle potřeby naředěn. Do kyvety bylo napipetováno 500 μl reakční směsi, 10 μl vzorku a 10 μl suspenze ADH. Obsah kyvety byl promíchán a po ukončení reakce (asi 10 minut) byla odečtena absorbance při 340 nm proti slepému vzorku. Každý připravený vzorek byl proměřen třikrát.

3.7 Stanovení sacharidů pomocí HPLC

3.7.1 Podmínky HPLC

Kolona: Prevail Carbohydrates ES RP-C18; 250 x 4,6 mm; 5mm

Mobilní fáze: acetonitril:voda (75:25)

Teplota: 30 °C

Objem nástřiku: 10 µl

Průtok mobilní fáze: 1,25 ml·min⁻¹

Detektor: ELSD

3.7.2 Kalibrační křivka

Byly připraveny kalibrační standardy fruktózy, glukózy a sacharózy o koncentracích 10,0; 50,0; 100,0; 200,0 a 500,0 mg·l⁻¹. Kalibrační roztoky byly proměřeny na HPLC, vždy tři nástřiky pro danou koncentraci. Z průměrných hodnot byly sestaveny kalibrační křivky.

3.7.3 Příprava vzorků

Vzorky moštů byly přefiltrovány přes mikrofiltry a tisíckrát naředěny. Každý vzorek byl proměřen třikrát. Poté byla vypočítána koncentrace a stanovena směrodatná odchylka.

3.8 Stanovení kyselin pomocí HPLC

3.8.1 Podmínky HPLC

Kolona: Polymer IEX H form WARTREX; 8µm

Mobilní fáze: 10 mM H₂SO₄

Teplota: 30 °C

Objem nástřiku: 20 µl

Průtok mobilní fáze: 1 ml·min⁻¹

Detektor: UV/VIS 210 nm

3.8.2 Kalibrační křivky

Byly připraveny kalibrační standardy kyseliny citronové, kyseliny vinné, kyseliny jablečné, kyseliny jantarové, kyseliny mléčné a kyseliny octové o koncentracích 0; 100,0; 250,0; a 500,0 mg·l⁻¹. Kalibrační roztoky byly proměřeny na HPLC, vždy tři nástřiky pro danou koncentraci. Z průměrných hodnot byly sestaveny kalibrační křivky.

3.8.3 Příprava vzorků

Vzorky moštů byly přefiltrovány přes mikrofiltry a naředěny vodou v poměru 1:1. Každý vzorek byl proměřen třikrát a byla vypočítána koncentrace a určena směrodatná odchylka.

3.9 Identifikace kvasinek vyskytujících se v moštu

3.9.1 Kultivační média a použité roztoky

Kultivační médium

Jako kultivační médium byl použit sladivý extrakt. Sladina byla získána z pivovaru extrakcí ječmenného sladu ve vodě. Pro laboratorní použití byla sladina upravena. Do odměrného válce o objemu 500 ml bylo nalito 200 ml sladiny. Sladina byla zředěna destilovanou vodou na cukernatost 7 °ČSN. pH roztoku bylo upraveno uhličitánem sodným na hodnotu 6,8. Takto připravený roztok byl rozlit do Erlenmayerových baněk a byla k němu přidána agaróza o koncentraci 1-3 % hm. Směs byla varem promíchána a nechala se sterilizovat v autoklávu 20 minut. Takto připravené kultivační médium bylo nalito do Petriho misky a jako šikmé agary do zkumavek.

Kultivační médium s antibiotikem

K připravenému kultivačnímu médiu bylo přidáno antibiotikum streptomycin sulfát v množství 80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Bylo naváženo 0,12 g streptomycinu sulfátu a navážka byla rozpuštěna v 10 ml destilované vody. Připravený roztok antibiotika byl přidán k 150 ml sterilního kultivačního média do Erlenmayerovy baňky. Médium bylo nalito na Petriho misky.

0,5 M roztok EDTA o pH 8

Bylo naváženo 9,36 g EDTA, navážka byla rozpuštěna v destilované vodě a převedena kvantitativně do 50 ml odměrné baňky. Pomocí 0,5% roztoku NaOH bylo pH upraveno na hodnotu 8 a odměrná baňka byla doplněna po rysku.

10x TBE pufr

Z připraveného 0,5 M roztoku EDTA o pH 8 bylo odebráno 40 ml do odměrné baňky o objemu 1000 ml. K roztoku bylo přidáno 108 g Tris a 55 g H_3BO_3 . Směs byla rozpuštěna v destilované vodě a odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Takto připravený roztok byl používán jako zásobní.

1x TBE pufr

Ze zásobního roztoku 10x TBE pufru bylo odebráno 100 ml do odměrné baňky o objemu 1000 ml a baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Takto připravený roztok byl používán pro přípravu gelů na elektroforézu.

Ethidium bromid

Bylo naváženo 10 mg EtBr do mikrozkušavky Eppendorf a tato navážka byla rozpuštěna v 1 ml destilované vody. Takto připravený roztok byl používán pro vizualizaci fragmentů DNA na gelu.

1x TBE pufr s ethidium bromidem

K připravenému 1x TBE pufru v odměrné baňce o objemu 1000 ml bylo přidáno 100 μ l ethidium bromidu. Takto připravený roztok byl používán jako vodivostní pufr při elektroforetické detekci fragmentů DNA.

2% agarózový gel

Byly naváženy 2 g agarózy na 100 ml 1x TBE pufru do 150 ml Erlenmayerovy baňky. Směs byla rozpuštěna opakovaným varem v mikrovlnné troubě. Po zchladnutí k ní byl přidán ethidium bromid v poměru 1:10000 k celkovému množství gelu. Takto připravený gel byl používán k elektroforetické detekci DNA fragmentů po PCR a také k elektroforetické detekci DNA fragmentů po restrikční analýze.

Délkový standard 100 bp

Délkový standard byl dodán připravený a mohl být proto rovnou pipetován na gel. Na gel byl nanášen v objemu 3 μ l.

3 M octanový pufr

Bylo naváženo 2,46 g CH_3COONa a navážka byla rozpuštěna v 7 ml destilované vody. Bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 5,5 pomocí koncentrované HCl. Roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 10 ml a doplněn destilovanou vodou po rysku. Takto připravený roztok byl uchováván při teplotě 4 °C.

80% ethanol

K 1,6 ml 96% ethanolu bylo přidáno 0,32 ml destilované vody a směs byla krátce zvortexována. Takto připravený roztok byl uchováván při teplotě -20 °C.

PCR směs

Při přípravě PCR směsi byly PCR komponenty uvedené v tab. 3-2 přidávány v uvedeném pořadí a smíchány. K takto připravenému MasterMixu o objemu 147,9 μ l bylo

přidáno 1,5 µl templátové DNA a 0,6 µl termostabilní Taq polymerázy. Při přípravě negativní kontroly byla místo templátové DNA použita sterilní voda o stejném objemu.

Tab. 3-2: PCR komponenty pro přípravu PCR směsi

PCR komponenty	Objem [µl]
sterilní voda	128,7
pufr	15,0
dNTP mix	3,0
primer ITS 1	0,6
primer ITS 4	0,6

3.9.2 Izolace čistých kultur kvasinek

Vzorky mladého vína odrůdy Rulandské bílé byly odebrány ve vinařství Štěpán Maňák ze Žádovic. Odtud pocházely také vzorky moštů odrůdy Hibernál, které byly odebrány v průběhu kvasného procesu. Vzorky byly přefiltrovány přes bakteriologické filtry a tyto filtry byly umístěny na Petriho misky na sladidinové živné médium s antibiotikem. Přefiltrované mošty a víno byly uloženy k dalšímu zpracování. Petriho misky se směsnými kulturami byly uloženy v termostatu při teplotě 26 °C několik dní kvůli dobrému namnožení kvasinkových kultur.

Po namnožení byly ze smíšených kultur kvasinek izolovány čisté kultury kvasinek několikanásobnou Kochovou zředovací metodou a křížovými roztěry. Při prvních třech ředění byly použity půdy s antibiotikem, aby se vyloučily nežádoucí bakterie. Proces ředění a křížových roztěrů byl opakován šestkrát a získané čisté kultury kvasinek byly kontrolovány mikroskopicky, aby se vyloučila kontaminace bakteriemi [57].

3.9.3 Kochova zředovací metoda

Práce probíhala ve sterilním boxu. Nejdříve byla z Petriho misky se směsnou kulturou odebrána dvě očka a přenesena do zkumavky s 10 ml sterilní vody. Obsah zkumavky byl promíchán na vortexu a ze zkumavky bylo odebráno mikropipetou 50 µl a přeneseno do druhé zkumavky s 10 ml sterilní vody. Obsah zkumavky byl znovu promíchán na vortexu a ze zkumavky byl mikropipetou odebrán 1 ml a přenesen do zkumavky s 9 ml sterilní vody. Obsah zkumavky byl opět promíchán na vortexu a ze zkumavky bylo odebráno mikropipetou 50 µl suspenze, která byla přenesena na Petriho misku se sladidinovým živným médiem, byl proveden křížový roztěr a misky byly vloženy do termostatu, ve kterém probíhala inkubace tři dny při teplotě 26 °C. Poté byly vybrané kolonie přeočkovány na malé misky a důkladně rozetřeny. Misky byly opět ponechány v termostatu při teplotě 26 °C. Celý proces byl

opakován šestkrát, dokud nebyly získány čisté kultury kvasinek. Ty byly pak uchovávány v ledničce na šikmém agaru pod parafinovým olejem [57].

3.9.4 Izolace DNA

K izolaci kvasinkové DNA byl využit komerční set Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit. Bylo postupováno podle přiloženého návodu k použití.

Nejprve bylo do rozbíjecí zkumavky (MicroBead tube) napipetováno 300 µl rozbíjecího pufru (MicroBead Solution), ve kterém byly poté rozsuspendovány dvě očka odebrané z kvasinkové kultury. Pak bylo do rozbíjecí zkumavky přidáno 50 µl roztoku MD1. Mikrozkumavky byly vloženy v horizontální poloze do vortexu a byly vortexovány při maximální rychlosti 10 minut. Poté byla směs centrifugována při 10000 otáčkách a teplotě 4 °C 1 minutu. I všechny ostatní centrifugace probíhaly při těchto podmínkách. Po centrifugaci bylo asi 350 µl supernatantu přeneseno do čisté mikrozkumavky o objemu 2 ml, bylo k němu přidáno 100 µl roztoku MD2, směs byla krátce promíchána na vortexu a inkubována 5 minut při teplotě 4 °C. Směs byla opět centrifugována a asi 450 µl supernatantu bylo přeneseno do další čisté mikrozkumavky, bylo k němu přidáno 900 µl roztoku MD3 a směs byla opět krátce promíchána na vortexu. 700 µl takto připravené směsi bylo přeneseno na kolonku, centrifugováno a přefiltrovaný roztok byl odstraněn. Na stejnou kolonku byl přenesen zbytek směsi o objemu asi 300 µl. Směs byla opět centrifugována a přefiltrovaný roztok byl odstraněn. Na kolonku bylo pak přidáno 300 µl roztoku MD4 a opět bylo centrifugováno. Přefiltrovaný roztok byl odstraněn a kolonka byla znovu centrifugována. Následně byla kolonka opatrně přenesena do čisté mikrozkumavky a do středu bílé membrány uvnitř kolonky bylo přidáno 50 µl roztoku MD5. Pak probíhala opět centrifugace, po které byla kolonka odstraněna a roztok DNA v mikrozkumavce byl pro další použití uchováván při teplotě - 20 °C [57].

3.9.5 PCR

K připravenému MasterMixu o objemu 147,7 µl bylo přidáno 1,5 µl templátové DNA a 0,6 µl termostabilní Taq polymerázy. Byla připravena také negativní kontrola, u které bylo místo templátové DNA přidáno 1,5 µl destilované vody. Směs byla promíchána na vortexu a vložena do termocykléru. Byl zvolen program podle teplotního a časového profilu PCR reakce a použitých primerů jak je uvedeno v tab. 3-3.

Tab. 3-3: Teplotní a časový profil PCR reakce

Jednotlivé kroky		Teplota [°C]	Čas [min]
počáteční denaturace		94	4
denaturace	25 cyklů	94	1
připojení primerů		48	0,5
polymerace		72	1
elongace		72	10

K amplifikaci v oblasti 5,8S-ITS rDNA byly využity primery ITS1 a ITS4. Sekvence jednotlivých primerů jsou uvedeny v tab. 3-4 [57].

Tab. 3-4: Sekvence primerů

Primer	Sekvence
ITS1	5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3'
ITS4	5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'

3.9.6 Elektroforetická detekce PCR produktů

Pro detekci PCR produktů byla použita horizontální elektroforéza na 2% agarózovém gelu, ke kterému byl přidán ethidium bromid v množství odpovídající 1/10 objemu gelu v μ l. Velikost vany byla zvolena podle počtu vzorků. Na malou vanu (14 jamek) bylo použito 40 ml gelu, na střední vanu (20 jamek) 60 ml gelu a na velkou vanu (50 jamek) 150 ml gelu. Po zatuhnutí byly na gel nanášeny vzorky s nanášecím pufrem v poměru 1 μ l pufru a 5 μ l vzorku. Na obou koncích gelu byl nanášen délkový standard 100 bp o objemu 3 μ l. Podle velikosti zvolené vany byly nastaveny podmínky elektroforézy. Na velké vaně probíhalo dělení fragmentů při konstantním napětí 65 V po dobu 2,5 hodin. Na střední vaně probíhalo dělení fragmentů při napětí 55 V po dobu 2 hodin a na malé vaně při napětí 45 V také 2 hodiny. Po ukončení elektroforézy byl gel přenesen do transluminátoru a pod UV světlem byl vyfocen pomocí programu Scion Image.

3.9.7 Přečištění PCR produktů

Při přečištění PCR produktů před restrikční analýzou bylo 20 μ l amplifikované DNA smícháno s 2 μ l octanového moštu. Směs byla krátce promíchána na vortexu a bylo k ní přidáno 60 μ l 96% ethanolu vychlazeného na teplotu - 20 °C. Směs byla centrifugována 30 minut při teplotě 4°C při 14000 otáčkách. Poté byl supernatant dekantován a přebytečný roztok byl slit. Do mikrozkušavky bylo k supernatantu přidáno 60 μ l 80% ethanolu a směs byla opět centrifugována při stejných podmínkách. Následně byl supernatant opět dekantován, přebytečný roztok byl slit a zbytek ethanolu v mikrozkušavkách byl vysušen v exikátoru po dobu 10 minut [57].

3.9.8 Restrikční analýza

K přečištěným PCR produktům bylo přidáno 13,4 µl sterilní vody, 1,5 µl pufru a 0,1 µl enzymu. Tyto objemy byly zvoleny na základě předchozích zkušeností. Vzorčky byly promíchány na vortexu a inkubovány při teplotě 37 °C 16 hodin. Pak byla teplota na 20 minut zvýšena kvůli inaktivaci enzymu. Použité enzymy a inaktivační teploty jsou uvedeny v tab. 3-5. Produkty po restrikční analýze byly elektroforeticky detekovány na 2% agarózovém gelu 2,5 hodiny podobným způsobem jako PCR produkty [57].

Tab. 3-5: Použité restrikční endonukleázy

Označení enzymu	Producent enzymu	Rozpoznávací místo na sekvenci	t (inkubace) [°C] 16 hodin	t (inaktivace) [°C] 20 minut
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegypticus</i>	5'...GG↓CC... 3' 3'...CC↑GG... 5'	37	80
<i>Hinfl</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'...G↓ANTC... 3' 3'...CTNA↑G... 5'	37	80
<i>HhaI</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	5'...GCG↓C... 3' 3'...C↑GCG... 5'	37	65
<i>TaqI</i> ^a	<i>Thermus aquaticus</i>	5'...T↓CGA... 3' 3'...AGC↑T... 5'	37	80

3.9.9 Zpracování výsledků v programu BioNumerics

Program BioNumerics je software určený k analýze biologických dat především k vyhodnocování fenotypů, sekvencí a gelů. V tomto programu byl vytvořen dendrogram genetické podobnosti identifikovaných kvasinek na základě UPGMA (unweighted pair-group average) shlukové analýzy. Tato analýza shluků neboli klastrová analýza se zabývá rozdělením většího počtu proměnných do tříd neboli shluků na základě jejich podobnosti. Soubor dat se dělí na shluky s ohledem na určité znaky, kterými jsou v programu BioNumerics velikosti označených fragmentů na elektroforetických gelech. Pokud jsou tyto znaky nemetrického charakteru, využívá klastrová analýza koeficient podobnosti, kterým je při hodnocení genetické podobnosti identifikovaných kvasinek Jaccardův koeficient (4):

$$S_j = \frac{a}{a + b + c + d} \quad (4)$$

kde *a*, *b*, *c*, *d* jsou počty shodných znaků.

Metoda UPGMA patří k nejjednodušším metodám získání fylogenetických stromů (dendrogramy) a je založena na tom, že bere za vzdálenost mezi dvěma shluky průměr vzdáleností mezi všemi páry objektů těchto shluků. Taxony, které jsou si nejvíce podobné, budou mít mezi sebou nejkratší vzdálenost. Tímto způsobem vznikne grafické zpracování

hierarchicky uspořádaných shluků ve formě dendrogramů. Tato metoda se využívá k taxonomickému zařazení organismů nebo k identifikaci nemocí a jejich stádií [55, 56].

4 Výsledky a diskuze

4.1 Identifikace aromaticky aktivních látek

Aromatické látky ve vzorcích moštů byly izolovány metodou SPME a poté byly detekovány pomocí GC-MS. Vyextrahované aromatické látky byly identifikovány porovnáním s knihovnou spekter a porovnáním s retenčními časy standardů.

4.1.1 Analýza reálných vzorků

Metodou SPME-GC-MS byly identifikovány aromatické látky ve vzorcích moštů odrůdy Hibernál a ve víně odrůdy Rulandské bílé. Tyto vzorky pocházely z vinařství Štěpána Maňáka ze Žádovic a byla pro jejich zakvašení použita autochtonní kvasinka, která byla izolována v naší laboratoři minulý rok z bobulí odrůdy Hibernál. Vzorky odrůdy Hibernál byly odebírány v průběhu kvasného procesu. U odrůdy Rulandské bílé byl odebrán až vzorek mladého vína. Aromatické látky v odrůdě Rulandské bílé byly porovnány s látkami přítomnými ve vzorku vína, pocházející od soukromého vinaře. Seznam vzorků je uveden v tab. 3-1. Podmínky a postup analýzy jsou uvedeny v kapitole 3.2. Identifikace vyextrahovaných aromatických látek byla provedena porovnáním s knihovnou spekter a porovnáním retenčních časů standardů.

Cílem bylo porovnat příspěvek námi vyizolované kvasinky, která byla použita k zakvašení, na aromatický profil jednotlivých vzorků kvasícího moštu a vzorků mladých vín Hibernál a Rulandské bílé. Identifikované aromatické látky byly porovnány také s aromatickými látkami přítomnými ve vzorcích vína Rulandské bílé, které pocházelo od soukromého vinaře a vzniklo spontánním kvašením. Ukázky chromatogramů jsou uvedeny v příloze 1, 2, 3 a 4.

4.1.2 Aromaticky aktivní látky identifikované ve vzorcích

Ve vzorku HIB-0, což byl vzorek odebraný ještě před zakvašením autochtonní kvasinkou, bylo identifikováno porovnáním s knihovnou spekter celkem 39 látek. Seznam látek i s retenčními časy je uveden v příloze 5. Ukázka chromatogramu je uvedena v příloze 1. V tomto vzorku bylo identifikováno 10 alkoholů, 6 aldehydů, 2 ketony, 4 estery, 2 kyseliny, 1 terpen a 14 dalších látek, které nemají významný vliv na výsledné aroma, nebo se jedná o nečistoty z kolony.

Ve vzorku HIB-1, což byl vzorek odebraný na počátku kvasného procesu po zaočkování autochtonní kvasinkou, bylo identifikováno také 39 látek, z toho 4 alkoholy,

21 esterů, 3 aldehydy, 1 keton, 4 kyseliny, 1 terpen a 5 dalších látek, které nemají významný vliv na výsledné aroma, nebo se jedná o nečistoty z kolony. Seznam těchto látek i s retenčními časy je uveden v příloze 6.

Ve vzorku HIB-2 bylo identifikováno celkově 52 látek, z toho 5 alkoholů, 23 esterů, 3 aldehydy, 1 keton, 7 kyselin, 1 terpen a 12 dalších látek které nemají významný vliv na výsledné aroma, nebo se jedná o nečistoty z kolony. Seznam těchto látek i s retenčními časy je uveden v příloze 7.

Ve vzorku HIB-3 bylo identifikováno 59 látek, z toho 9 alkoholů, 29 esterů, 3 aldehydy, 1 keton, 4 kyseliny, 1 terpen a 12 dalších látek, které nemají významný vliv na výsledné aroma, nebo se jedná o nečistoty z kolony. Seznam těchto látek i s retenčními časy je uveden v příloze 8.

Ve vzorku HIB-4 bylo identifikováno 55 látek, z toho 7 alkoholů, 23 esterů, 3 aldehydy, 2 ketony, 4 kyseliny, 1 terpen a 15 dalších látek které nemají významný vliv na výsledné aroma, nebo se jedná o nečistoty z kolony. Seznam těchto látek i s retenčními časy je uveden v příloze 9.

Ve vzorku HIB-5, což je vzorek po proběhlém kvašení na počátku zrání vín, bylo identifikováno 48 látek. Z těchto látek bylo identifikováno 11 alkoholů, 20 esterů, 3 aldehydy, 1 keton, 4 kyseliny, 1 terpen a 8 dalších látek, které nemají významný vliv na výsledné aroma, nebo se jedná o nečistoty z kolony. Ukázka chromatogramu je uvedena v příloze 2. Seznam těchto látek i s retenčními časy je uveden v příloze 10.

Ve vzorku HIB-6, což je vzorek vína, které leželo na kvasinkách, bylo identifikováno 39 látek. Z toho bylo 8 alkoholů, 15 esterů, 3 aldehydy, 1 keton, 5 kyselin, 2 terpeny a 6 dalších látek, které nemají významný vliv na výsledné aroma, nebo se jedná o nečistoty z kolony. Seznam těchto látek i s retenčními časy je uveden v příloze 11.

Ve vzorku vína Rulandské bílé (RB), které pocházelo z vinařství Štěpána Maňáka ze Žádovic a bylo zaočkováno autochtonní kvasinkou pocházející z odrůdy Hibernál, bylo identifikováno celkem 56 látek, z toho 8 alkoholů, 28 esterů, 3 aldehydy, 3 ketony, 3 kyseliny, 1 terpen a 10 dalších látek, které nemají významný vliv na výsledné aroma, nebo se jedná o nečistoty z kolony. Ukázka chromatogramu je uvedena v příloze 3. Seznam těchto látek i s retenčními časy je uveden v příloze 12.

Ve vzorku vína Rulandské bílé (RB-S), které pocházelo od soukromého vinaře a vzniklo spontánním kvašením bylo identifikováno celkem 51 látek. Z toho bylo 13 alkoholů, 13 esterů, 4 aldehydy, 6 kyseliny, 1 terpen a 14 dalších látek, které nemají významný vliv na výsledné aroma, nebo se jedná o nečistoty z kolony. Ukázka

chromatogramu je uvedena v příloze 4. Seznam vzorků i s retenčními časy je uveden v příloze 13.

Z chromatogramů vzorku HIB-5 a RB, které jsou uvedeny v příloze 2 a 3 je patrné, že obě mladá vína mají podobný aromatický profil. Lze tedy říci, že na aroma mladého vína má vliv odrůda, ale ve velké míře také použitá kvasinka.

Porovnáním identifikovaných látek ve vzorku Rulandské bílé RB a ve vzorku Rulandské bílé od soukromého vinaře RB-S lze říci, že aromatický profil těchto vín není stejný. To může být způsobeno tím, že u vzorku RB-S bylo při kvašení využito přirozené mikroflóry a také tím, že tento vzorek pochází z jiného prostředí.

Estery

K nejvýznamnějším aromatickým látkám vyskytujícím se ve víně patří estery. Tyto látky vznikají reakcí alkoholů s organickými kyselinami a přispívají především k ovocnému charakteru vína. Estery vznikají nejvíce v první fázi kvašení, v dalších fázích může docházet k poklesu jejich koncentrace. Nejvíce esterů bylo nalezeno ve vzorcích HIB-3 a RB, naopak nejméně esterů byla nalezeno ve vzorku HIB-0.

Největší vliv na sensorické vlastnosti vína mají estery kyseliny octové. Octan ethylnatý byl identifikován ve všech vzorcích. Tento ester patří k hlavním sensoricky aktivním látkám ve víně a projevuje se v nižších koncentracích ovocnými až kyselými tóny, ve vyšších koncentracích připomíná jeho vůně spíše lepidlo a může proto přispět k negativnímu aroma ve víně. Většinou se pohybuje ve víně v koncentraci 22,5 až 63,5 mg.l⁻¹ a jeho prahová koncentrace v 10% ethanolu je 7,5 mg.l⁻¹ [59]. Isoamylacetát byl identifikován ve všech vzorcích kromě vzorku HIB-0 a má banánové nebo hruškové aroma, jeho prahová koncentrace v 10% ethanolu je 0,03 mg.l⁻¹ a jeho obsah ve víně se pohybuje v koncentraci 0,1 až 3,4 mg.l⁻¹ [59]. K dalším esterů, identifikovaným ve všech vzorcích kromě HIB-0, patřil hexylacetát, jehož aroma je popisováno jako sladké až parfémové. Jeho prahová koncentrace ve víně je stanovena na 0,7 mg.l⁻¹ a vyskytuje se v koncentraci do 4,8 mg.l⁻¹ [58].

Z dalších esterů, které mají významný vliv na aroma vína, byl ve všech vzorcích identifikován ethyldekanoát, jehož obsah bývá ve víně do 2,1 mg.l⁻¹ a jeho prahová koncentrace v 10% ethanolu je stanovena na 0,2 mg.l⁻¹. Tento ester dodává vínu květinovou až mýdlovou vůni [59]. Ethylbutanoát byl identifikován ve vzorcích HIB-1 až HIB-6 a také v obou vzorcích odrůdy Rulandské bílé. Ve víně se ethylbutanoát vyskytuje v průměrné koncentraci 0,01 až 1,8 mg.l⁻¹ a jeho prahová koncentrace v 10% ethanolu je 0,2 mg.l⁻¹. Aroma tohoto esteru je květinové až ovocné [59].

V těchto vzorcích byl identifikován také ethylhexanoát. Vůně tohoto esteru připomíná zelené jablko a ve víně se vyskytuje v koncentraci 0,03 až 3,4 mg.l⁻¹ a jeho prahová koncentrace v 10% obj. ethanolu je 0,05 mg.l⁻¹ [59]. Ethylheptanoát, který se vyskytoval ve vzorcích HIB-1 až HIB-5 má typické hroznové aroma a ve vyšších koncentracích se vyskytuje u muškátových odrůd. Jeho prahová koncentrace v 10% ethanolu je 2,2 μg.l⁻¹ [58].

Ve vzorcích HIB-1 až HIB-6 a ve vzorku Rulandské bílé (RB) byl nalezen také methyloktanoát, který svým aroma připomíná pomeranč a vyskytuje se často v muškátových nebo ryzlinkových odrůdách. Jeho prahová koncentrace je stanovena na 200 μg.l⁻¹ [58].

Ethyloktanoát byl přítomný ve všech vzorcích a projevuje se mýdlovým aroma. Jeho koncentrace ve víně je v rozmezí 0,05 až 3,8 mg.l⁻¹ a prahová koncentrace v 10% obj. ethanolu je 0,02 mg.l⁻¹ [59]. Ve stejných vzorcích byl identifikován také 2-fenylethylacetát, jehož aroma je ovocné, květinové a připomínající růže. Ve víně bývá obsažen v koncentraci až do 18,5 mg.l⁻¹ a jeho prahová koncentrace v 10% obj. ethanolu je 0,25 mg.l⁻¹ [59].

Isopentylhexanoát byl nalezen ve vzorcích HIB-1 až HIB-3 a ve vzorcích RB. Tento ester dodává vínu aroma sladkého ovoce a jeho prahová koncentrace v 10% ethanolu je 1 mg.l⁻¹ [58].

9-ethyldekanoát byl identifikován ve všech vzorcích kromě vzorku HIB-0. Prahová koncentrace tohoto esteru je v 10% ethanolu 100 μg.l⁻¹ a jeho vůně je po růžích. Ve stejných vzorcích byl stanoven také ethyldodekanoát, který dodává vínu sladké, květinové nebo ovocné aroma a jeho prahová koncentrace v 10% ethanolu je 3500 μg.l⁻¹ [58].

Ethylnonanoát byl nalezen ve vzorcích HIB-2 až HIB-5 ve vzorku RB. Ester se projevuje ovocným nebo květinovým aroma a jeho prahová koncentrace v 10% ethanolu je stanovena na 1300 μg.l⁻¹ [58].

Isoamyloktanoát, který byl stanoven ve vzorcích HIB-1 až HIB-6 a ve vzorku RB, dodává vínu sladké, ovocné, někdy sýrové nebo olejové aroma. Jeho prahová koncentrace v 10% ethanolu je 152 μg.l⁻¹ [58]. Methyltetradekanoát byl nalezen ve vzorcích HIB-3, HIB-4 a RB a může vínu dodávat voskové aroma. Ve vzorku Rulandské bílé byl ještě identifikován ethylhexadekanoát, jehož prahová koncentrace je v 10% ethanolu 1500 μg.l⁻¹ a dodává vínu ovocné, sladké, někdy pronikavé a tukové aroma [58]. Ve vzorku Rulandské bílé od soukromého vinaře byl navíc identifikován ethyl-2-hexenoát, jehož aroma je ovocné a ananasové a diethylbutandioát, jehož aroma je ovocné a prahová koncentrace v 10% ethanolu je 1200 μg.l⁻¹ [58].

Vyšší alkoholy

Vyšší alkoholy se v bílých vínech vyskytují v koncentraci 150 až 550 mg·dm⁻³. V nižších koncentracích dodávají vínu plnost a kompletnost, ve vyšších koncentracích mohou vést k silné až svíravé chuti a vůni vína. Tyto látky vznikají v průběhu fermentace a jejich prekurzorem jsou aminokyseliny. Přítomnost dusíku má tedy velký vliv na koncentraci vyšších alkoholů ve víně. Také přítomnost různých kmenů kvasinek a nesaccharomycetních kvasinek vede k vyšší koncentraci a rozmanitosti vyšších alkoholů [60].

Nejmenší zastoupení alkoholů (4) bylo přítomno ve vzorku HIB-1, naopak nejvíce (13) alkoholů bylo identifikováno ve vzorku Rulandské bílé od soukromého vinaře.

Ve všech vzorcích byl nalezen 3-methylbutan-1-ol. Tento alkohol se projevuje ovocnou nebo banánovou vůní. Jeho koncentrace ve víně se v literatuře pohybuje od 6,0 do 490 mg.l⁻¹. A jeho prahová koncentrace je stanovena řádově v mg.l⁻¹ [59]. Dále se ve všech vzorcích vyskytoval hexan-1-ol, který se projevuje bylinným až travnatým aroma a ve víně se vyskytuje obvykle v rozmezí koncentrací 0,3 až 12,0 mg.l⁻¹ s prahovou koncentrací v 10% obj. ethanolu 4 mg.l⁻¹ [59]. K dalším alkoholům nalezeným ve všech vzorcích patří 2-fenylethylalkohol. Vůně tohoto alkoholu je ovocná, květinová a může připomínat růže. Zpravidla se ve víně vyskytuje v obsahu 4,0 až 197 mg.l⁻¹ a jeho prahová koncentrace v 10% obj. ethanolu 10 mg.l⁻¹ [59].

Ve vzorcích HIB-2 až HIB-6 a v obou vzorcích Rulandského bílého byl dále nalezen 2,3-butandiol, který má ovocné aroma a jeho prahová koncentrace v 10% ethanolu je 150 mg.l⁻¹ [58]. Ve vzorku HIB-0 byl nalezen také 1-okten-3-ol který má aroma připomínající kaštanový květ a jeho prahová koncentrace je 1 µg.l⁻¹, dále 2-nonanol, jež se projevuje ovocným aroma a jeho prahová koncentrace je stanovena na 58 µg.l⁻¹ [58]. Benzylalkohol byl identifikován ve vzorcích HIB-0 a Rulandské bílé od soukromého vinaře. Tento alkohol se projevuje sladkým a ovocným aroma a může se vyskytovat i ve vyšších koncentracích, jeho prahová koncentrace v 10% ethanolu je 200 mg.l⁻¹ [58].

Ve vzorku HIB-0 byl identifikován také (Z)-2-hexen-1-ol, jehož aroma je bylinné a travnaté a například ve víně Chardonay byl tento alkohol identifikován v koncentraci 70 µg.l⁻¹ a jeho prahová koncentrace v 10% ethanolu je 400 µg.l⁻¹ [58]. Ve vzorku HIB-3 byl navíc identifikován 1-dodekanol, který má v nižších koncentracích květinovou vůni, ale ve vyšších koncentracích může být jeho aroma nepříjemné. Ve vzorcích HIB-5 a Rulandské bílé od soukromého vinaře byl identifikován 3-(methylthio)-1-propanol, který vykazuje vůni po vařené zelenině, ve víně Chardonay byl nalezen v koncentraci 28,35 µg.l⁻¹ [58].

K dalšímu identifikovanému alkoholu patří isobutanol, který byl nalezen ve vzorcích Rulandské bílé od soukromého vinaře a ve vzorku HIB-6. Aroma tohoto alkoholu je květinové a připomíná růže. Jeho průměrná koncentrace ve víně se pohybuje od 90 do 174 mg.l⁻¹ a jeho prahová koncentrace v 10% ethanolu je 40 mg.l⁻¹ [59]. Ve vzorcích RB od soukromého vinaře byl přítomen ještě 2-ethyl-1-hexanol, jehož aroma je květinové a po sladkém ovoci. Jeho koncentrace například ve víně Chardonay byla stanovena na 12150,1 µg.l⁻¹ [58].

Aldehydy

Nejvíce aldehydů (6) bylo identifikováno ve vzorku HIB-0, v ostatních vzorcích byly identifikovány 3 až 4 aldehydy.

Acetaldehyd tvoří až 90 % celkových aldehydů přítomných ve víně a patří k nejdůležitějším sensorickým složkám vína. Jeho průměrný obsah ve víně je 30 až 300 mg.l⁻¹ a jeho prahová koncentrace v 10% ethanolu je 100 až 125 mg.l⁻¹ [59]. Je tvořen kvasinkami a bakteriemi oxidací ethanolu, jeho celkové množství závisí teda na druhu a kmenu kvasinek. Při nižších koncentracích má acetaldehyd příjemné ovocné aroma, ale ve vyšších koncentracích může být aroma velmi pronikavé, palčivé a může připomínat shnilá jablka. V tomto měření byl acetaldehyd přítomný ve vzorcích HIB-1 až HIB-6 i v obou vzorcích Rulandského bílého.

Ve všech vzorcích byl přítomen benzaldehyd. Tento aldehyd má mandlovou vůni a například ve víně odrůdy Chardonay byl obsažen v koncentraci 56,12 µg.l⁻¹ [58].

Ve vzorcích HIB-0 a HIB-4 a v obou vzorcích Rulandského bílého byl nalezen oktanal, který má tukové aroma a jeho koncentrace například ve víně Chardonay byla 8,51 µg.l⁻¹. Ve vzorku HIB-0 byl nalezen také hexanal, který má sladké aroma připomínající pomeranč, dále (E)-2-hexenal, (Z)-2-heptenal a 4-ethylbenzaldehyd, které mají ovocné aroma a ve víně Chardonay byla jejich koncentrace od 9 až do 50 µg.l⁻¹ [58]. Ve vzorku HIB-6 byl nalezen ještě nonanal, jehož aroma je květinové a citrusové a jeho koncentrace ve víně Chardonay byla 42,09 µg.l⁻¹ [58].

Ketony

K identifikovaným ketonům patří 2-tridekanon. Tento keton byl přítomný ve vzorcích HIB-0 až HIB-5 a vzorku Rulandské bílé (RB) a vyznačuje se mléčným a oříškovým aroma [58].

Kyseliny

Až 90 % kyselin ve víně je tvořeno kyselinou octovou, která je produkována kvasinkami jako meziprodukt glykolýzy. Nadměrná koncentrace této kyseliny je většinou způsobena metabolickou aktivitou divokých kvasinek a také oxidací ethanolu aerobními octovými bakteriemi. Její koncentrace se ve víně pohybuje v rozmezí 0,2 až 0,6 g.l⁻¹. V koncentraci nad 0,7 až 1,1 g.l⁻¹ dodává vínu štiplavé až octové aroma [59]. V tomto měření byla tato kyselina přítomna ve všech vzorcích, kromě vzorku od soukromého vinaře.

Ve všech vzorcích byla identifikována kyselina oktanová, ve vzorcích HIB-1 až HIB-6 a ve vzorku RB byla nalezena kyselina hexanová a ve všech vzorcích kromě HIB-0 byla identifikována kyselina dekanová. Tyto kyseliny vznikají v metabolismu lipidů a také mohou být tvořeny katabolicky z mastných kyselin s dlouhými řetězci. Kvasinky mohou využívat tyto katabolické zdroje na začátku kvasného procesu. Tyto kyseliny jsou ve víně obsaženy v koncentraci řádově mg.l⁻¹. Prahová koncentrace kyseliny hexanové byla stanovena v 10% obj. roztoku ethanolu na 3000 μg.l⁻¹, u oktanové kyseliny to je 10 000 μg.l⁻¹ a u dekanové 6 μg.l⁻¹. Pokud je koncentrace těchto kyselin ve víně rovna prahové koncentraci, nebo je pod tímto prahem, přispívají tyto kyseliny ke složitosti vinného aroma. V koncentraci nad prahovou koncentrací se projevují žluklou vůní nebo vůní po sýru a mohou mít negativní vliv na celkové aroma vína. V některých pracích se uvádí, že kyselina hexanová, oktanová a dekanová mají dohromady při určitých koncentracích pozitivní vliv na buket mladého vína [58, 61].

Ve vzorku HIB-2 byla dále identifikována kyselina 3-methylbutanová, undekanová a nonanová. Prahová koncentrace kyseliny 3-methylbutanové v 10% ethanolu je 3000 μg.l⁻¹ a její aroma je kyselé. Prahová koncentrace nonanové kyseliny v 10% ethanolu je také 3000 μg.l⁻¹. Kyselina nonanová a undekanová se projevuje tukovým aroma. Ve vzorku Rulandské bílé od soukromého vinaře byla navíc identifikována kyselina pentanová, jejíž prahová koncentrace je 3000 μg.l⁻¹ a má sýrové aroma [58, 61].

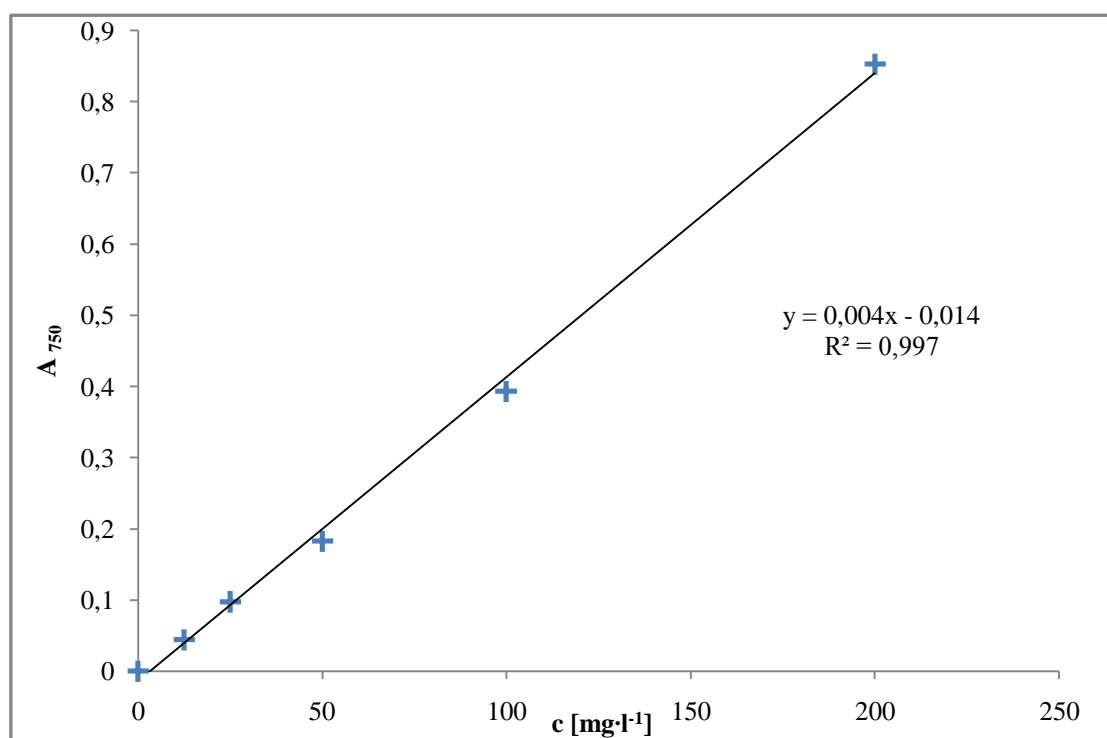
Další látky

Z dalších látek, které se ve velké míře podílejí na celkovém aroma vína, byl ve všech vzorcích nalezen linalool. Tento monoterpenický alkohol se ve velké míře podílí na primárním aroma. Je tedy přítomen už v hroznech, kde je glykosidicky vázán na glukózu a působením glukosidáz se uvolňuje v průběhu fermentace. Tato látka dodává vínu sladké, citrusové, květinové aroma, často připomínající růže. Koncentrace ve víně se uvádí mezi 1,7 až 10 μg.l⁻¹ a jeho prahová koncentrace je ve víně stanovena na 1,5 μg.l⁻¹ [28, 59].

K dalším terpenům nalezeným ve vzorku HIB-6 patří α -Terpineol. Prahová koncentrace tohoto monoterpenového alkoholu je $1000 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a vínu dodává sladké, květinové aroma [58].

4.2 Stanovení obsahu celkových polyfenolických látek

Obsah celkových polyfenolických sloučenin byl stanoven spektrofotometricky po reakci s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Postup stanovení je uveden v kapitole 3.3. Absorbance všech vzorků byla měřena při vlnové délce 750 nm a byla odečítána s přesností na 3 desetinná místa. Koncentrace celkových polyfenolických sloučenin byla vypočítána pomocí regresní rovnice kalibrační křivky kyseliny gallové. Tuto kalibrační křivku zobrazuje graf 4-1.

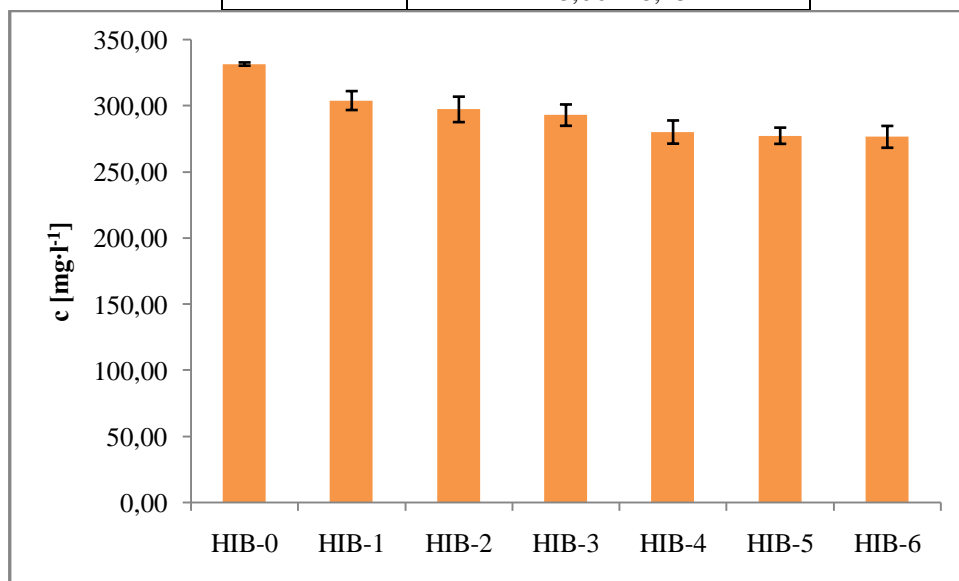


Graf 4-1: Kalibrační křivka stanovení polyfenolů

Graf 4-2 a tab. 4-1 zobrazuje obsah celkových polyfenolických sloučenin ve vzorcích moštu odrůdy Hibernál v průběhu kvasného procesu a při zrání vína a ve vzorku mladého vína odrůdy Rulandské bílé. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát, byla vypočítána koncentrace a stanovena směrodatná odchylka.

Tab. 4-1: Koncentrace celkových polyfenolů

Vzorky	c [mg·l ⁻¹]
HIB-0	331,78 ± 1,23
HIB-1	304,19 ± 7,15
HIB-2	297,52 ± 9,62
HIB-3	293,18 ± 8,06
HIB-4	280,39 ± 8,76
HIB-5	277,59 ± 6,14
HIB-6	276,76 ± 5,87
RB	248,06 ± 8,25



Graf 4-2: Změna koncentrace celkových polyfenolů během kvasného procesu

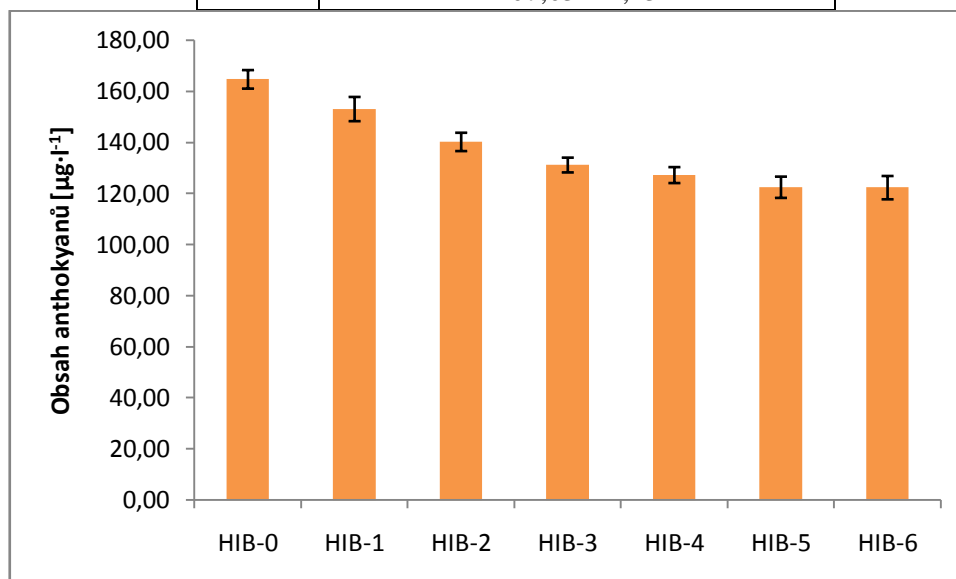
Průměrný obsah polyfenolů v moštu je v literatuře uváděn v koncentraci 0,1 až 2,5 g·l⁻¹ [10]. Celkové polyfenolické sloučeniny v odrůdě Hibernál byly naměřeny v rozsahu 276,76 - 331,78 mg·l⁻¹. Nejvyšší koncentrace dosahoval vzorek HIB-0 (331,78 ± 1,23 mg·l⁻¹), což je vzorek odebraný ještě před zakvašením autochtonní kvasinkou. V průběhu kvasného procesu došlo k mírnému snížení koncentrace celkových polyfenolů na hodnotu 276,76 ± 5,87 mg·l⁻¹ u vzorku HIB-6. V mladém víně odrůdy Rulandské bílé byla koncentrace polyfenolů stanovena na hodnotě 248,06 ± 8,25 mg·l⁻¹.

4.3 Stanovení celkových anthokyanových barviv

Celková anthokyanová barviva byla stanovena postupem uvedeným v kapitole 3.4. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát a celková absorbance byla vypočítána podle rovnice (1). Poté byl obsah pigmentu přepočítán na kyanidin-3-glukosid podle rovnice (2). Průměrné výsledky koncentrace i se stanovenou směrodatnou odchylkou zobrazuje graf 4-3 a tab. 4-2.

Tab. 4-2: Koncentrace anthokyanů

Vzorky	Koncentrace anthokyanů [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]
HIB-0	$164,69 \pm 3,63$
HIB-1	$153,07 \pm 4,74$
HIB-2	$142,21 \pm 3,59$
HIB-3	$131,16 \pm 2,89$
HIB-4	$127,23 \pm 3,12$
HIB-5	$122,46 \pm 4,16$
HIB-6	$122,31 \pm 4,56$
RB	$107,03 \pm 2,13$



Graf 4-3: Změna koncentrace anthokyanů během kvasného procesu

Anthokyany jsou červená barviva hroznů. Dávají barvu růžovému a červenému vínu. V hotovém červeném víně je obsah anthokyanů do $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. V bílém víně se tyto barviva vyskytují minoritně. Monomerní pigment v moštu a víně odrůdy Hibernál byl stanoven v rozmezí $122,31 \pm 4,56$ až $164,69 \pm 3,63 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Nejvyšší koncentrace monomerního pigmentu bylo stanoveno ve vzorku HIB-0 ($164,69 \pm 3,63 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), což je vzorek odebraný před zakvašením autochtonní kvasinkou a mohou se v něm vyskytovat anthokyany ze slupky. Slupky hroznů odrůdy Hibernál jsou šedé až narůžovělé [4]. Poté dochází k poklesu koncentrace v průběhu kvasného procesu a zrání vína na hodnotu $122,31 \pm 4,56 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ u vzorku HIB-6. U vzorku vína Rulandské bílé (RB) byla koncentrace anthokyanů stanovena na hodnotě $107,03 \pm 2,13 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

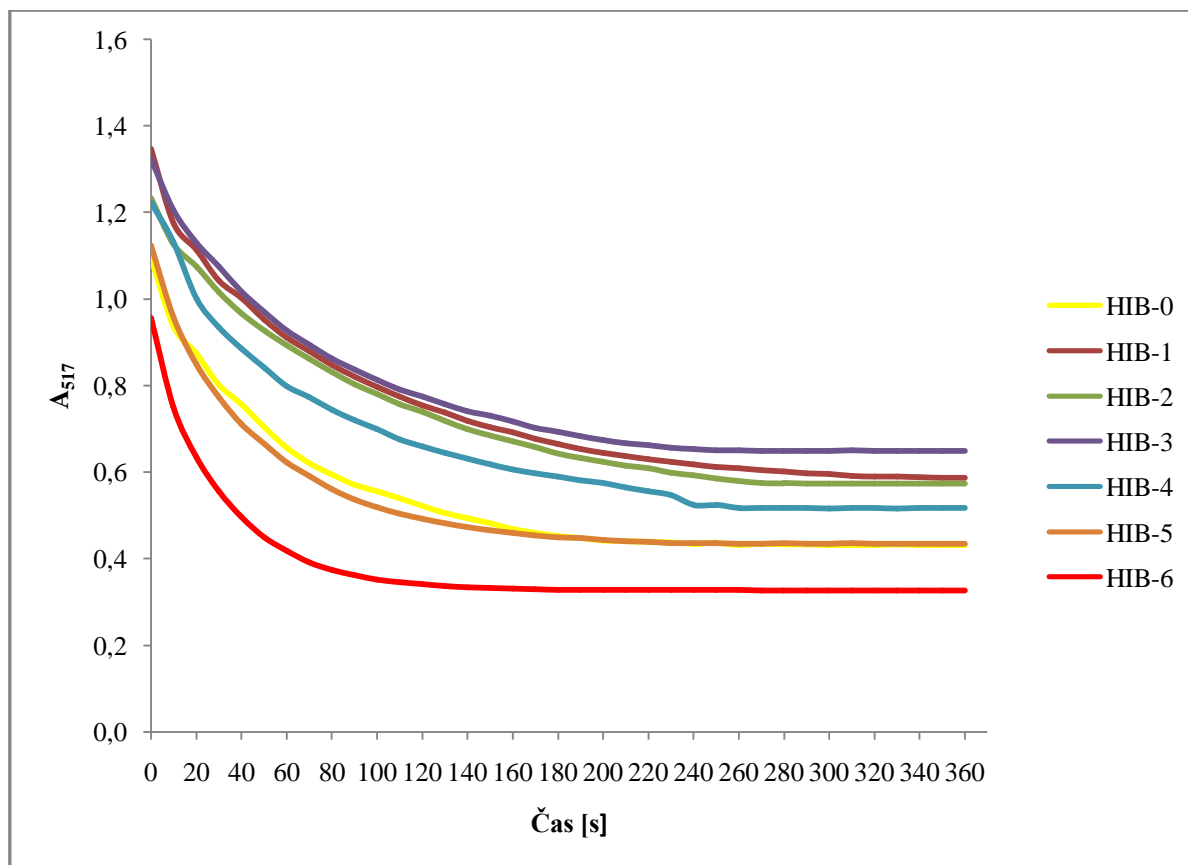
4.4 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Podle postupu uvedeného v kapitole 3.5 byla stanovena antioxidační aktivita u vzorků moštu Hibernál v průběhu kvasného procesu a také na počátku zrání a u vzorku hotového vína

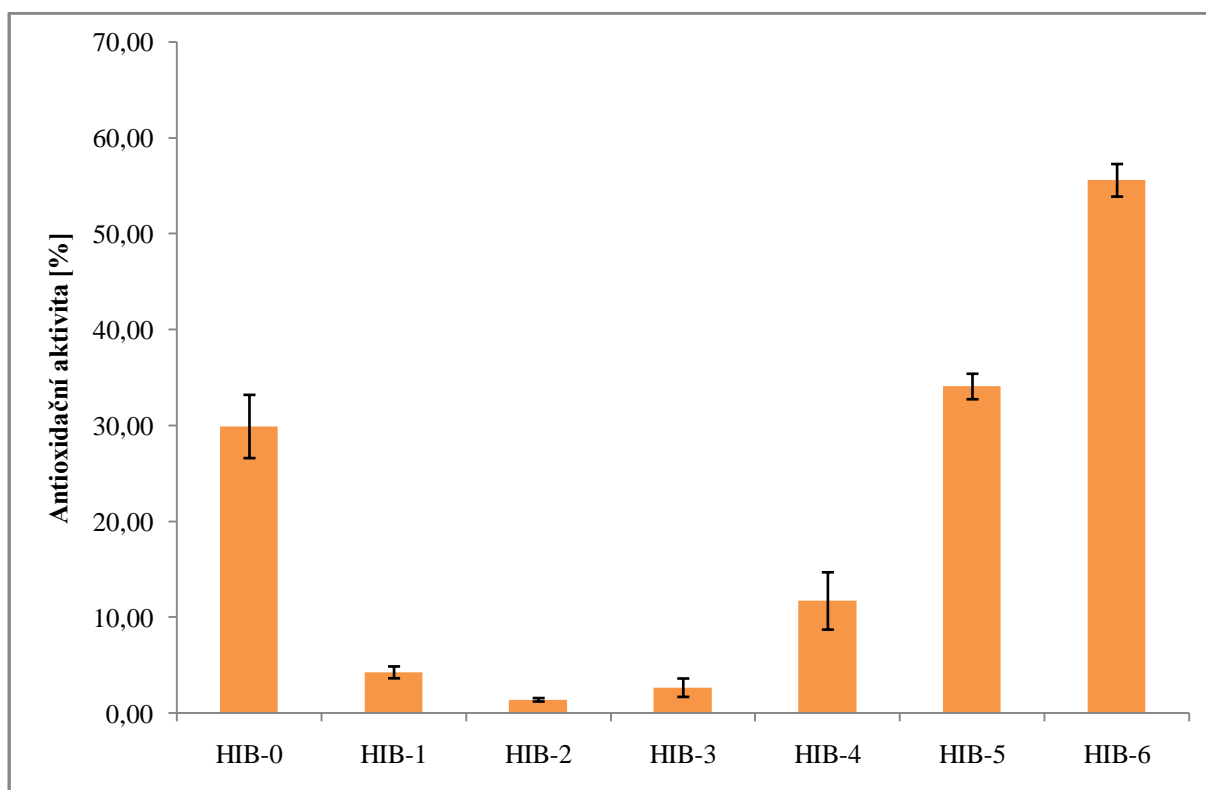
odrůdy Hibernal a u vzorku mladého vína odrůdy Rulandské bílé. Při reakci syntetického radikálu DPPH s antioxidantem docházelo k redukci radikálu. Tato redukce byla provázána změnou zbarvení a tato změna byla měřena při 517 nm. Každých 10 sekund po dobu 6 minut byla odečítána absorbance s přesností na 3 desetinná místa. Každý vzorek byl proměřen třikrát. Zhášecí aktivita byla poté vypočítána z rovnice (3) v 90 s a vyjádřena v procentech. Všechny vzorky byly před měřením naředěny methanolem v poměru 1:2, aby byl zajištěn optimální časový průběh reakce. Vypočítané hodnoty zhášecí aktivity jsou uvedeny v tab. 4-3. Graf 4-4 ukazuje závislost absorbance na čase. Graf 4-5 znázorňuje celkové srovnání zhášecí aktivity během kvasného procesu a při zrání vína.

Tab. 4-3: Stanovená antioxidační aktivita

Vzorky	Antioxidační aktivita [%]
HIB-0	29,94 ± 3,30
HIB-1	4,29 ± 0,62
HIB-2	1,43 ± 1,08
HIB-3	2,70 ± 0,96
HIB-4	11,74 ± 2,99
HIB-5	34,11 ± 1,33
HIB-6	55,62 ± 1,70
RB	23,60 ± 1,57



Graf 4-4: Změna závislosti absorbance na čase během kvasného procesu

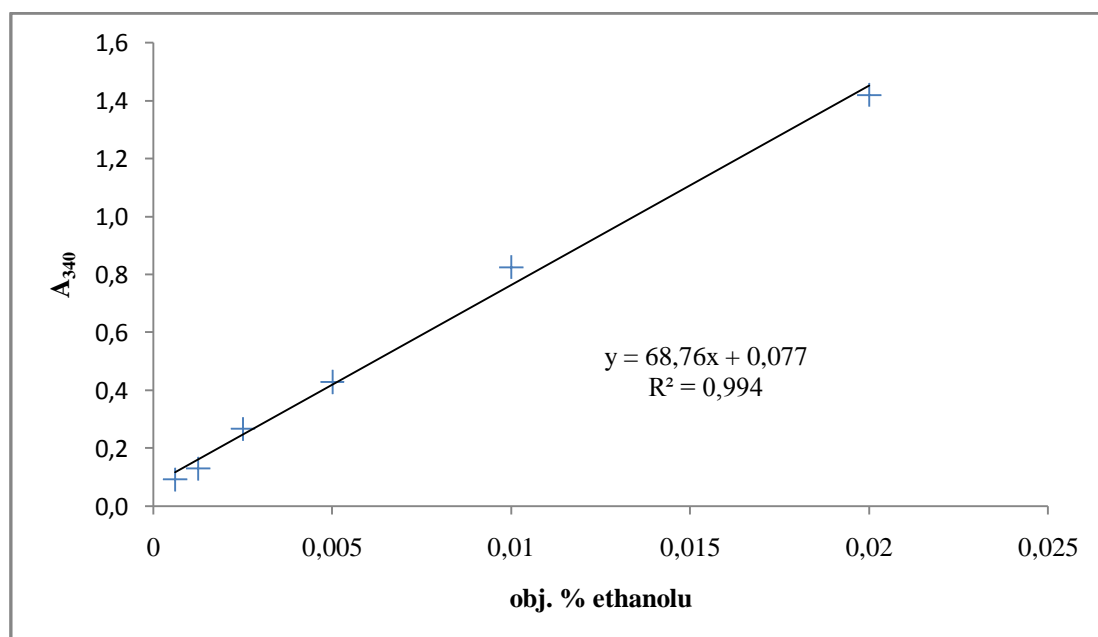


Graf 4-5: Změna antioxičáční aktivity v průběhu kvasného procesu

Před začátkem kvasného procesu u vzorku HIB-0 byla zhášecí aktivita stanovena na $29,94 \pm 3,30$ %. V průběhu kvašení došlo ke snížení zhášecí aktivity na hodnotu $1,43 \pm 1,08$ %. Od vzorku HIB-4 došlo k prudkému nárůstu zhášecí aktivity až na hodnotu $55,62 \pm 1,70$ % u vzorku HIB-6. Ke zvýšení antioxičáční aktivity přispívá i metabolický systém kvasinek. Ve vzorku mladého vína odrůdy Rulandské bílé (RB) byla zhášecí aktivita stanovena na hodnotě $23,60 \pm 1,57$ %.

4.5 Enzymatické stanovení ethanolu

Obsah ethanolu byl stanoven enzymaticky podle postupu uvedeného v kapitole 3.6. Absorbance všech vzorků byla měřena při vlnové délce 340 nm a byla odečítána s přesností na 3 desetinná místa. Koncentrace ethanolu byla vypočítána pomocí regresní rovnice kalibrační křivky. Tuto kalibrační křivku zobrazuje graf 4-6.

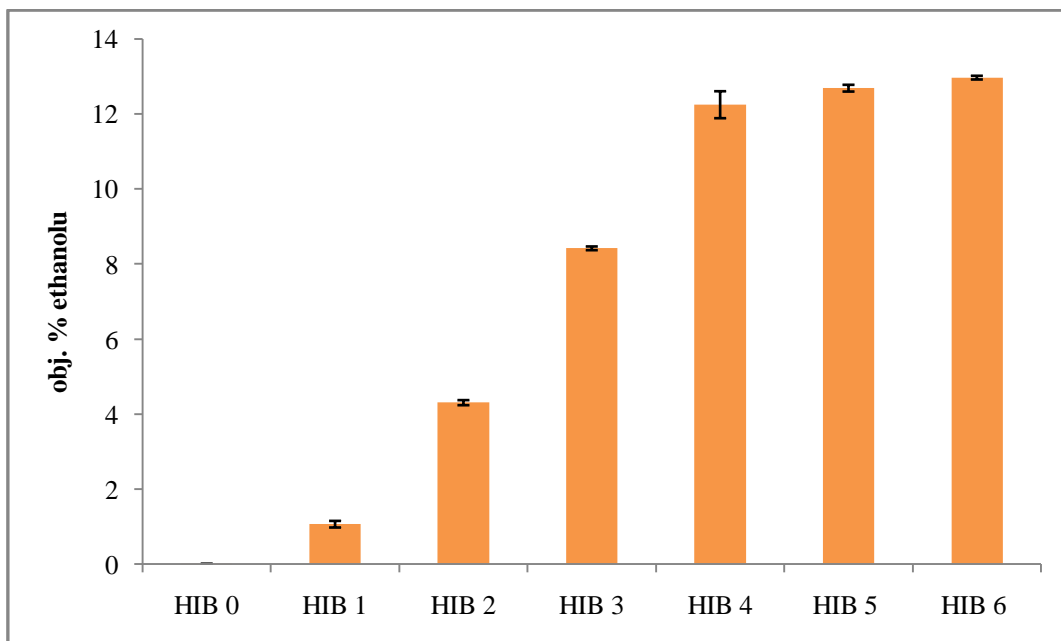


Graf 4-6: Kalibrační křivka stanovení ethanolu

Graf 4-7 a tab. 4-4 zobrazují obsah ethanolu ve vzorcích moštu odrůdy Hibernal v průběhu kvasného procesu a vzorku mladého vína odrůdy Rulandské bílé. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát, byla vypočítána koncentrace a stanovena směrodatná odchylka. V průběhu kvašení docházelo k postupnému zvyšování koncentrace ethanolu až na hodnotu $12,98 \pm 0,05$ obj. %. Obsah ethanolu v mladém víně odrůdy Rulandské bílé (RB) byl stanovena na $11,97 \pm 0,02$ obj. %. Průměrný obsah ethanolu ve víně je v literatuře uváděn na 12,6 obj. % [23].

Tab. 4-4: Koncentrace ethanolu

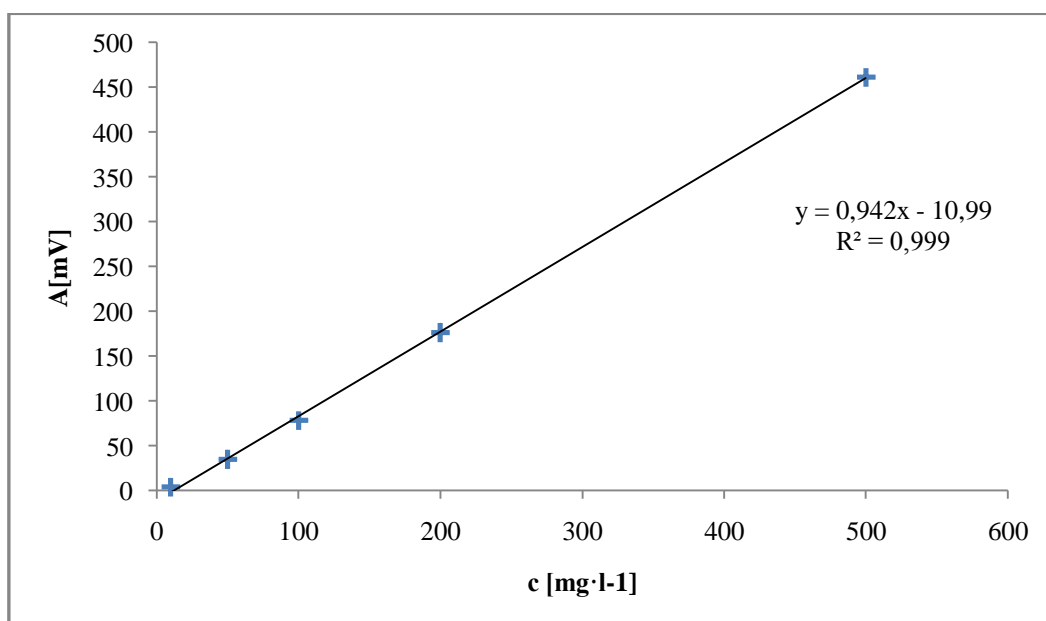
Vzorky	Obj. % ethanolu
HIB-0	$0,01 \pm 0,01$
HIB-1	$1,07 \pm 0,09$
HIB-2	$4,32 \pm 0,07$
HIB-3	$8,43 \pm 0,05$
HIB-4	$12,26 \pm 0,36$
HIB-5	$12,70 \pm 0,09$
HIB-6	$12,98 \pm 0,05$
RB	$11,97 \pm 0,02$



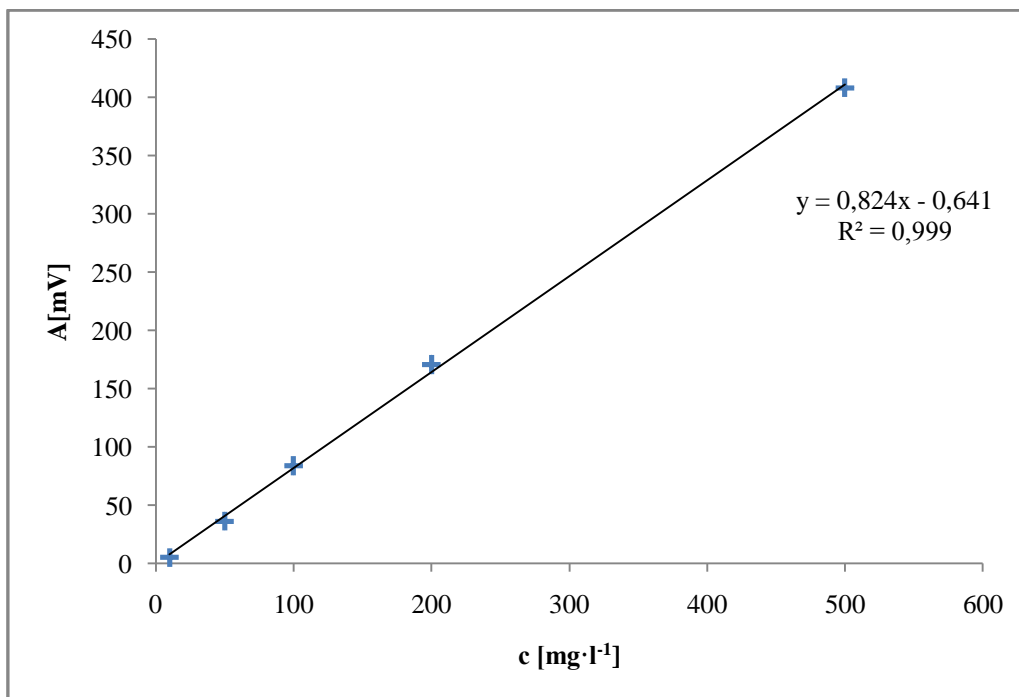
Graf 4-7: Nárůst koncentrace ethanolu v průběhu kvasného procesu

4.6 Stanovení sacharidů pomocí HPLC

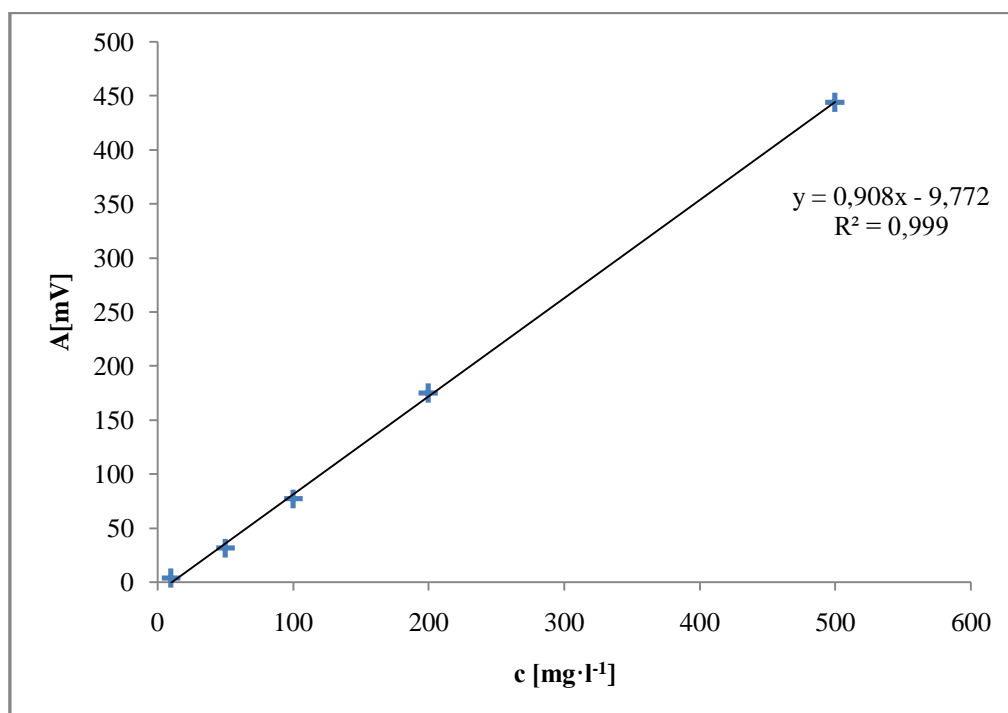
Pro stanovení sacharidů byla použita metoda HPLC s mobilní fází acetonitril:voda (75:25) a pro detekci byl využit ELSD detektor. Podmínky a postup stanovení jsou uvedeny v kapitole 3.7. Koncentrace celkových sacharidů byla vypočítána pomocí regresních rovnic kalibračních křivek, které zobrazují graf 4-8, graf 4-9 a graf 4-10. Ukázky chromatogramů jsou uvedeny v příloze 14 a v příloze 15.



Graf 4-8: Kalibrační křivka fruktózy



Graf 4-9: Kalibrační křivka glukózy



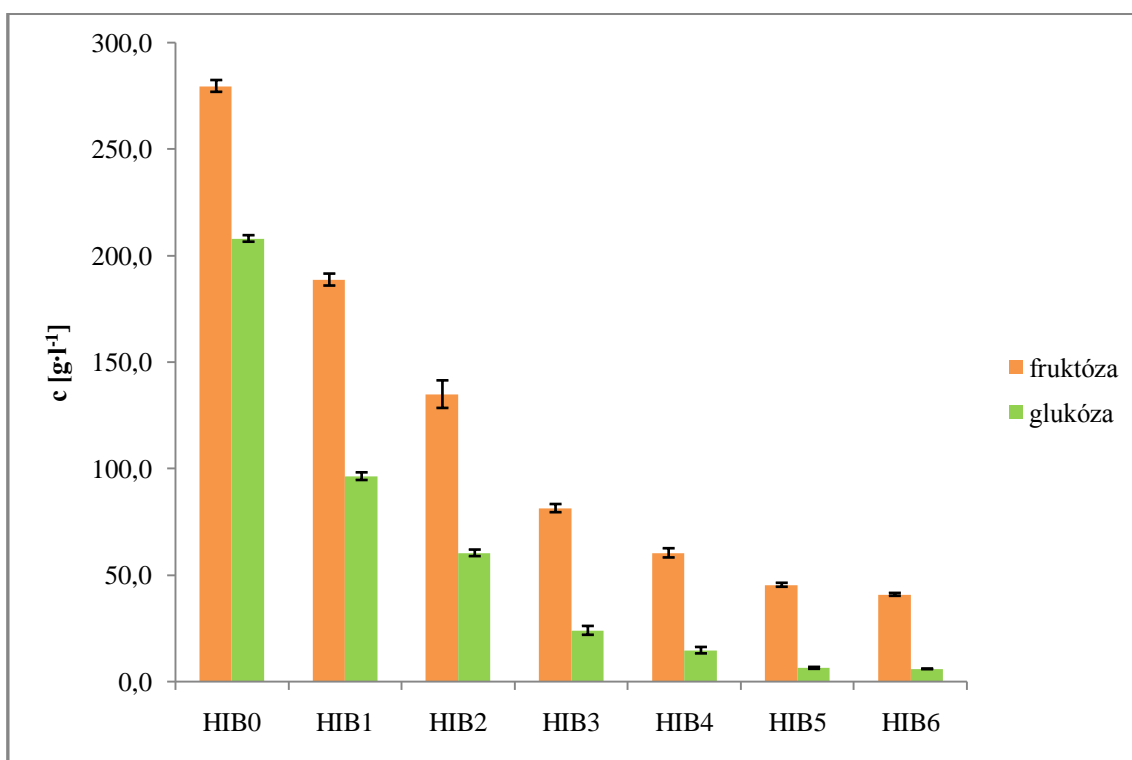
Graf 4-10: Kalibrační křivka sacharózy

Graf 4-11 a tab. 4-5 zobrazují vypočítanou koncentraci sacharidů a jejich změny během kvasného procesu. V moštu a ve víně byla identifikována fruktóza a glukóza, sacharóza přítomna nebyla. Před zahájením kvašení obsahoval mošt $279,7 \pm 2,8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ fruktózy a $208,1 \pm 1,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ glukózy. Během kvašení a zrání vína došlo k poklesu koncentrace fruktózy na $41,0 \pm 0,7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a glukózy na $6,0 \pm 0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Tomuto poklesu sacharidů odpovídá nárůst

obsahu ethanolu jak uvádí graf 4-7. V mladém víně odrůdy Rulandské bílé byla koncentrace fruktózy stanovena na $24,8 \pm 1,9 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a koncentrace glukózy na $8,1 \pm 0,3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tab. 4-5: Koncentrace sacharidů

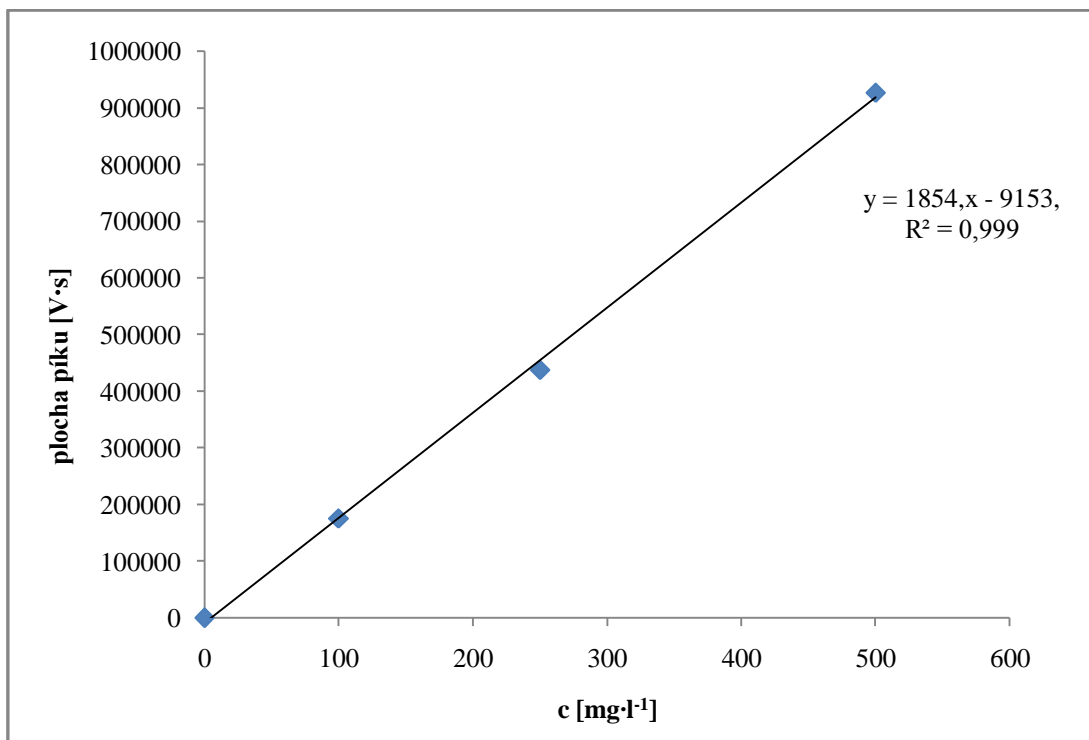
Vzorky	Fruktóza [g·l ⁻¹]	Glukóza [g·l ⁻¹]
HIB-0	279,7 ± 2,8	208,1 ± 1,5
HIB-1	188,8 ± 2,8	96,5 ± 1,8
HIB-2	135,0 ± 6,5	60,5 ± 1,5
HIB-3	81,5 ± 1,9	24,1 ± 2,1
HIB-4	60,5 ± 2,2	14,8 ± 1,5
HIB-5	45,5 ± 0,9	6,5 ± 0,5
HIB-6	41,0 ± 0,7	6,0 ± 0,1
RB	24,8 ± 1,9	8,1 ± 0,3



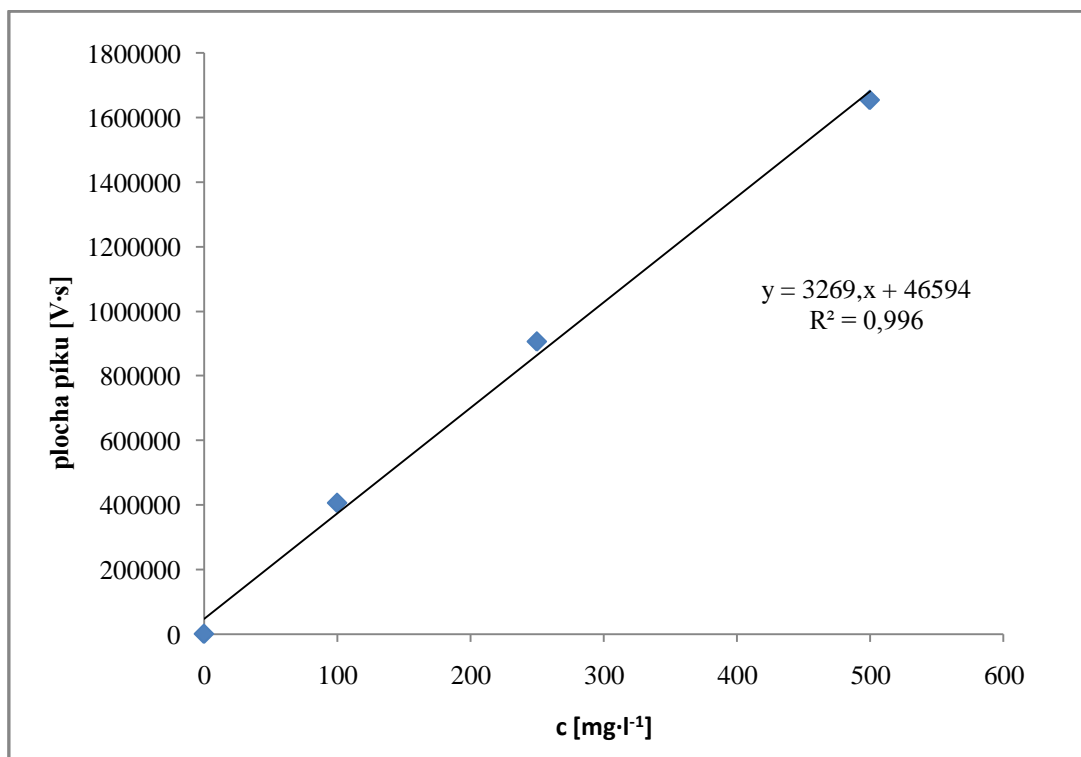
Graf 4-11: Pokles koncentrace sacharidů během kvasného procesu

4.7 Stanovení kyselin pomocí HPLC

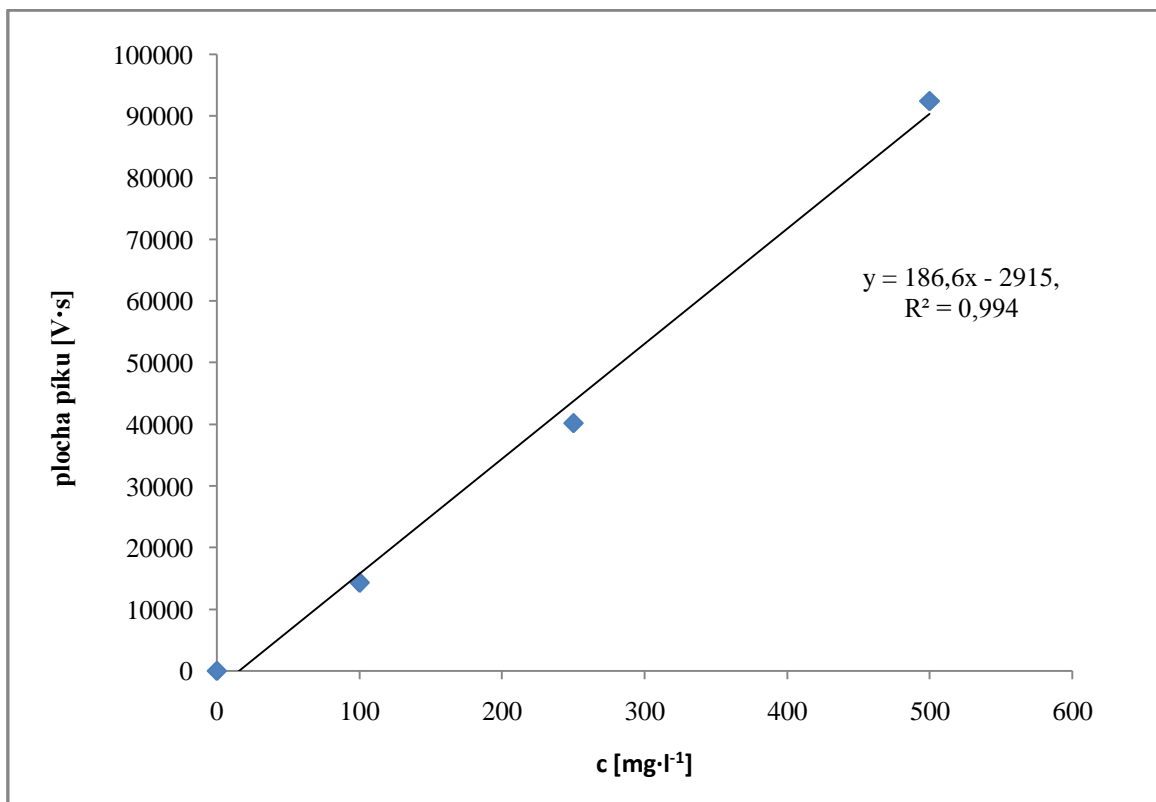
Pro stanovení kyselin byla použita metoda HPLC s mobilní fází 10 mM H₂SO₄ a pro detekci byl využit UV/VIS 210 nm detektor. Podmínky a postup stanovení jsou uvedeny v kapitole 3.8. Koncentrace kyselin byla vypočítána pomocí regresních rovnic kalibračních křivek, které zobrazují graf 4-12, graf 4-13, graf 4-14. Další kalibrační křivky jsou uvedeny v příloze 17, 18 a 19. Ukázka chromatogramu je uvedena v příloze 16.



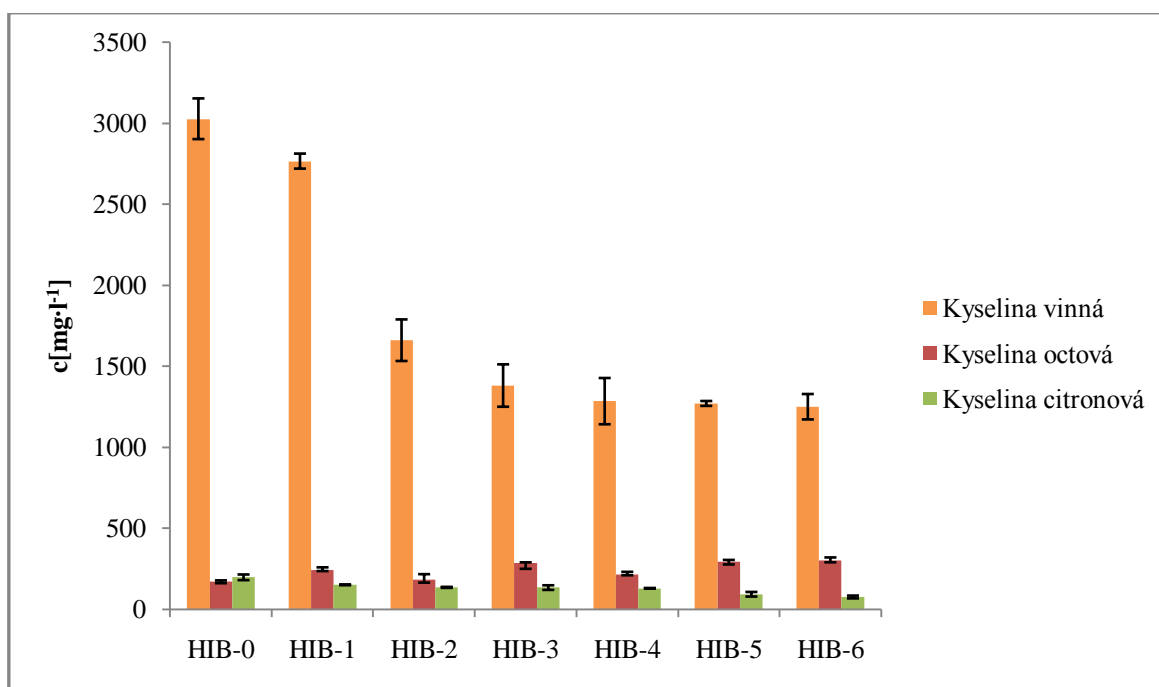
Graf 4-12: Kalibrační křivka kyseliny citronové



Graf 4-13: Kalibrační křivka kyseliny vinné



Graf 4-14: Kalibrační křivka kyseliny octové



Graf 4-15: Změna koncentrace kyselin během kvasného procesu

Tab. 4-6: Stanovená koncentrace kyselin

Vzorky	Kyselina vinná [mg·l ⁻¹]	Kyselina octová [mg·l ⁻¹]	Kyselina citronová [mg·l ⁻¹]
HIB-0	3026,76 ± 125,64	172,00 ± 12,26	196,07 ± 17,40
HIB-1	2765,41 ± 46,38	239,77 ± 5,13	149,34 ± 2,08
HIB-2	1659,74 ± 128,29	181,09 ± 17,93	133,89 ± 3,07
HIB-3	1379,87 ± 130,84	283,03 ± 34,49	132,63 ± 14,24
HIB-4	1283,64 ± 142,73	214,03 ± 5,45	128,27 ± 1,99
HIB-5	1269,46 ± 15,09	291,22 ± 15,78	91,49 ± 14,18
HIB-6	1249,23 ± 78,33	300,75 ± 12,07	74,68 ± 8,66
RB	1262,09 ± 108,56	289,96 ± 18,03	86,75 ± 14,15

Graf 4-15 zobrazuje stanovené koncentrace identifikovaných kyselin a jejich změny během kvasného procesu. V moštu byla identifikována kyselina vinná, kyselina citronová a kyselina octová. Obsah kyseliny vinné se v literatuře pohybuje okolo 6 g·l⁻¹ v severnějších oblastech a u jižnějších vinic se obsah této kyseliny pohybuje okolo 2 až 3 g·l⁻¹ [23]. V moštu Hibernal byl stanoven obsah této kyseliny před zahájením kvašení na hodnotě 3,03 ± 0,13 g·l⁻¹. V průběhu kvašení a zrání vína došlo k poklesu koncentrace z důvodu vysrážení kyseliny ve formě vinného kamene na hodnotu 1,25 ± 0,08 g·l⁻¹. V mladém víně odrůdy Rulandské bílé byl stanoven obsah kyseliny vinné na 1,26 ± 0,11 g·l⁻¹.

Kyselina citronová bývá přítomna v moštu v relativně nízkých koncentracích 50 až 300 mg·l⁻¹ [25]. Během kvašení může být přeměněna na diacetyl. V moštu Hibernal bylo před začátkem kvašení identifikováno 196,08 ± 17,40 mg·l⁻¹. V průběhu kvašení došlo k mírnému poklesu koncentrace na hodnotu 74,68 ± 8,66 mg·l⁻¹. U vzorku Rulandské bílé byl obsah této kyseliny stanoven na 86,75 ± 14,15 mg·l⁻¹.

Kyselina octová bývá ve víně přítomna v množství 0,3 až 0,6 g·l⁻¹. V koncentraci nad 0,7 až 1,1 g·l⁻¹ dodává vínu štiplavé až octové aroma, které je nežádoucí [59]. V moštu Hibernal byla identifikována kyselina octová v koncentraci 172,00 ± 12,26 mg·l⁻¹. V průběhu kvašení došlo k mírnému nárůstu koncentrace na hodnotu 300,74 ± 12,07 mg·l⁻¹. U vzorku Rulandské bílé byl obsah této kyseliny stanoven na 289,96 ± 18,03 mg·l⁻¹.

4.8 Identifikace kvasinek v moštu

Cílem bylo identifikovat a taxonomicky zařadit kvasinky izolované z bílého vína odrůdy Rulandské bílé a porovnat je s kvasinkami izolovanými a identifikovanými ze vzorků odrůdy Hibernal. Všechny vzorky pocházely z vinařství Štěpána Maňáka ze Žádovic a byly zaočkovány autochtonní kvasinkou, která pocházela z bobulí odrůdy Hibernal a byla vyizolována a vyčištěna minulý rok.

4.8.1 Kultivace kvasinkových kultur

Vzorky byly pro izolaci a následnou identifikaci přítomných kvasinek odebrány do sterilních lahví. Seznam je uveden v tab. 3-1. Poté byly sterilně přefiltrovány přes bakteriologické filtry. Odfiltrované směsné kultury byly kultivovány na Petriho miskách na sladidlovém živném médiu s antibiotikem v termostatu při teplotě 26 °C po dobu několik dní. Z těchto směsných kultur byly získány čisté kultury kvasinek několikanásobnou Kochovou metodou a křížovými roztěry jak je uvedeno v kapitole 3.9.2 a 3.9.3.

4.8.2 Izolace DNA

K izolaci DNA z čistých kultur kvasinek byl využit komerční set CleanTM Microbial DNA Isolation Kit. Izolace probíhala postupem uvedeným v kapitole 3.9.4. Pro další použití byla vyizolovaná DNA uchovávána v mrazáku při teplotě -20 °C a byla použita k amplifikaci a restrikční analýze.

4.8.3 Amplifikace DNA pomocí PCR

Izolovaná DNA byla amplifikována pomocí PCR postupem uvedeným v kapitole 3.9.5. K amplifikaci byly použity nespecifické fragmenty ITS1 a ITS4. PCR produkty byly elektroforeticky rozděleny na 2% agarózovém gelu postupem uvedeným v kapitole 3.9.6. Po vyhodnocení byly získány fragmenty o délce 880 bp. Porovnáním velikosti fragmentů s databází lze usoudit, že se jedná o kvasinku rodu *Saccharomyces*. Délky jednotlivých fragmentů jsou uvedeny v tab. 4-7. Ukázka elektroforeogramu PCR produktů je uvedena v příloze 20.

Tab. 4-7: Velikost amplikonů oblastí 5,8S-ITS

Vzorky	Velikost PCR produktu [bp]
RB-2	880
RB-9	880
RB-10	880
RB-14	880
RB-18	880

4.8.4 Restrikční analýza

Naamplifikované úseky DNA byly přečištěny postupem uvedeným v kapitole 3.9.7 a byly podrobeny restrikční analýze. Byly použity 4 restrikční endonukleázy a to *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI* a *TaqI*^o. Postup restrikční analýzy je uveden v kapitole 3.9.8.

Restrikční endonukleáza *HaeIII*

Restrikční endonukleáza *HaeIII* má rozpoznávací místo pro sekvenci 5' ...GG↓CC ... 3' DNA. Zjištěné velikosti fragmentů jsou uvedeny v tab. 4-8. Ukázka elektroforeogramu restrikčních fragmentů je uvedena v příloze 21.

Tab. 4-8: Velikost restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *HaeIII*

Vzorky	Velikost PCR produktu [bp]	RF [bp]
RB-2	880	330+240+180+140
RB-9	880	330+240+180+140
RB-10	880	330+240+180+140
RB-14	880	330+240+180+140
RB-18	880	330+240+180+140

Restrikční endonukleáza *HinfI*

Jako další restrikční endonukleáza byla použita *HinfI*. Tento enzym má rozpoznávací místo pro sekvenci 5' ...G↓ANTC... 3' DNA. Zjištěné velikosti fragmentů jsou zobrazeny v tab. 4-9. Ukázka elektroforeogramu restrikčních fragmentů je uvedena v příloze 22.

Tab. 4-9: Velikost restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *HinfI*

Vzorky	Velikost PCR produktu [bp]	RF [bp]
RB-2	880	370+130
RB-9	880	370+130
RB-10	880	370+130
RB-14	880	370+130
RB-18	880	370+130

Restrikční endonukleáza *HhaI*

Jako třetí v pořadí byla použita restrikční endonukleáza *HhaI*, která má rozpoznávací místo pro sekvenci 5' ...GCG↓C ...3' DNA. Zjištěné velikosti fragmentů jsou uvedeny v tab. 4-10. Ukázka elektroforeogramu restrikčních fragmentů je uvedena v příloze 23.

Tab. 4-10: Velikost restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *HhaI*

Vzorky	Velikost PCR produktu [bp]	RF [bp]
RB-2	880	370+340+150
RB-9	880	370+340+150
RB-10	880	370+340+150
RB-14	880	370+340+150
RB-18	880	370+340+150

Restrikční endonukleáza *TaqI*^a

Jako poslední byla použita restrikční endonukleáza *TaqI*^a, která má rozpoznávací místo pro sekvenci 5' ...T↓CGA ...3' DNA. Zjištěné velikosti fragmentů jsou uvedeny v tab. 4-10. Ukázka elektroforeogramu restrikčních fragmentů je uvedena v příloze 24.

Tab. 4-11: Velikost restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *TaqI*^a

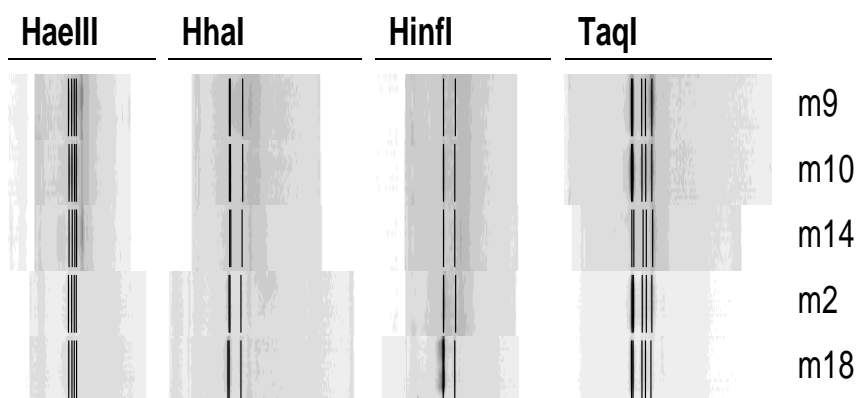
Vzorky	Velikost PCR produktu [bp]	RF [bp]
RB-2	880	300+280+150+110+70
RB-9	880	300+280+150+110+70
RB-10	880	300+280+150+110+70
RB-14	880	300+280+150+110+70
RB-18	880	300+280+150+110+70

4.8.5 Genetická podobnost kvasinek izolovaných z mladého vína odrůdy Rulandské bílé s kvasinkami izolovanými z moštů a vína odrůdy Hibernál.

Získané elektroforeogramy z jednotlivých restrikčních analýz byly upraveny a zpracovány ve statistickém programu BioNumerics. Tento program na základě klastrové analýzy (UPGMA) fragmentů DNA po restrikční analýze porovnává genetickou podobnost analyzovaných kvasinek.

Porovnáním délek restrikčních fragmentů uvedených na obr. 4-1 a srovnáním s databází a dalšími studii lze určit, že se ve vzorcích mladého vína odrůdy Rulandské bílé pravděpodobně nachází kvasinka rodu *Saccharomyces*.

Tato kvasinka byla porovnána s kvasinkami izolovanými z moštu odrůdy Hibernál v průběhu kvasného procesu. Obě odrůdy byly před zakvašením přefiltrovány a na jejich zakvašení byla použita autochtonní kvasinka, která byla izolována z prostředí vinice odrůdy Hibernál. Porovnáním restrikčních fragmentů kvasinek izolovaných z odrůdy Rulandské bílé (popsané v předchozích kapitolách) s restrikčními fragmenty kvasinek izolovaných z moštu odrůdy Hibernál tab. 4-12 je patrné, že v obou odrůdách byla opravdu izolována a identifikována stejná kvasinka rodu *Saccharomyces*.



Obr. 4-1: Porovnání délek restrikčních fragmentů kvasinek izolovaných ze vzorků RB

Tab. 4-12: Velikost PCR produktů a restrikčních fragmentů kvasinek izolovaných z moštu Hibernál v průběhu kvasného procesu

Odběr	Označení vzorku	Velikost PCR produkt [bp]	Velikost restrikčních fragmentů <i>HaeIII</i> [bp]	Velikost restrikčních fragmentů <i>HinfI</i> [bp]	Velikost restrikčních fragmentů <i>HhaI</i> [bp]	Velikost restrikčních fragmentů <i>TaqI</i> ^α [bp]
HIB-1	6	880	330+240+180+140	370+130	370+340+150	300+280+150+110+70
	22	880	330+240+180+140	370+130	370+340+150	300+280+150+110+70
HIB-2	8	880	330+240+180+140	370+130	370+340+150	300+280+150+110+70
	25	880	330+240+180+140	370+130	370+340+150	300+280+150+110+70
HIB-3	1	880	330+240+180+140	370+130	370+340+150	300+280+150+110+70
	15	880	330+240+180+140	370+130	370+340+150	300+280+150+110+70
	16	880	330+240+180+140	370+130	370+340+150	300+280+150+110+70
	17	880	330+240+180+140	370+130	370+340+150	300+280+150+110+70
	19	880	330+240+180+140	370+130	370+340+150	300+280+150+110+70
HIB-4	3	880	330+240+180+140	370+130	370+340+150	300+280+150+110+70
	4	880	330+240+180+140	370+130	370+340+150	300+280+150+110+70
	11	880	330+240+180+140	370+130	370+340+150	300+280+150+110+70
	12	880	330+240+180+140	370+130	370+340+150	300+280+150+110+70
	13	880	330+240+180+140	370+130	370+340+150	300+280+150+110+70

5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá sledováním vlivu kvasinek na chemické a senzorické vlastnosti vyráběného vína. Teoretická část se věnuje v první části popisu odrůdy Hibernal a technologii výroby vína se zaměřením na kvasný proces. Dále je v této části popsána cytologie kvasinek a detailně jsou popsány i vybrané rody kvasinek, které jsou důležité z potravinářského hlediska a to rod *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces* a *Kloeckera*. Další kapitoly se věnují popisu chemického složení hroznového moštu a vína se zaměřením na aromatické látky. V závěru teoretické části práce jsou popsány metody stanovení aromatických látek pomocí SPME-GC-MS, dále HPLC a metody pro identifikaci kvasinek PCR-RFLP a PCR, které byly využity v experimentální části diplomové práce.

K analýze vzorků byla použita metoda SPME-GC-MS. Analyzovány byly mošty získané v průběhu kvasného procesu a víno odrůdy Hibernal, dále také mladé víno odrůdy Rulandské bílé. U obou těchto odrůd byla na zakvašení využita autochtonní kvasinka, která pocházela z prostředí vinice Hibernal. Vzorky pocházely z vinařství Štěpána Maňáka ze Žádovic. Další vzorek vína Rulandské bílé pocházel od soukromého vinaře, který při výrobě tohoto vína využil kvašení spontánním způsobem.

V průběhu kvasného procesu docházelo u moštů odrůdy Hibernal ke zvýšení počtu identifikovaných esterů a kyselin. Na začátku kvašení došlo ovšem k poklesu počtu identifikovaných vyšších alkoholů. Během dalšího kvašení jejich počet opět narůstal. V průběhu zrání vína na kvasinkách došlo ke snížení počtu identifikovaných aromatických látek. Aromatický profil vína Rulandské bílé, které vzniklo s využitím stejné kvasinky, je podobný aromatickému profilu moštu a vína Hibernal. V obou odrůdách bylo identifikováno velké množství esterů, které dodávají vínu svěží, ovocné a květinové tóny. Lze tedy říci, že na aroma vína se kromě odrůdovosti velkou mírou podílejí využití kvasinky. Ve víně, které pocházelo od soukromého vinaře, bylo identifikováno méně esterů, ale více vyšších alkoholů než u předchozích vzorků a bylo zjištěno, že aromatický profil tohoto vína je odlišný od ostatních vzorků.

U moštu Hibernal byly v průběhu kvasného procesu sledovány různé chemické parametry. Následně byly tyto parametry stanoveny i v mladém víně této odrůdy a odrůdy Rulandské bílé. Při porovnání mladých vín lze říci, že mladé víno Hibernal (HIB-5) obsahovalo více polyfenolů, anthokyanů, ethanolu, kyselin a sacharidů než mladé víno Rulandské bílé a mělo také vyšší antioxidační aktivitu.

K izolaci a identifikaci kvasinek byly použity vzorky mladého vína Rulandské bílé, které byly odebrány 28.10.2015. K amplifikaci byla zvolena oblast 5,8S-ITS rDNA a použity primery ITS1 a ITS4. Poté byly PCR produkty podrobeny restrikční analýze, ke které byly využity restrikční endonukleázy *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI* a *TaqI*^α. Bylo zjištěno, že v mladém víně odrůdy Rulandské bílé jsou přítomny kvasinky rodu *Saccharomyces*. Porovnáním s kvasinkami izolovanými z moštů Hibernál v průběhu kvasného procesu bylo zjištěno, že se jedná o stejnou kvasinku rodu *Saccharomyces*.

6 LITERATURA

- [1] PAVLOUŠEK, Pavel. *Pěstování révy vinné: moderní vinohradnictví*. Praha: Grada, c2011, 333 s. ISBN 978-80-247-3314-2.
- [2] QUEROL, Amparo. a G. H. FLEET. *Yeasts in food and beverages*. 1. Berlin: Springer, c2006. ISBN 978-354-0283-881.
- [3] SABATE, Josepa, Josep CANO, Braulio ESTEVE-ZARZOSO a José M. GUILLAMÓN. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological Research* [online]. 2002, **157**(4), 267-274 [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1078/0944-5013-00163. ISSN 09445013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501304700865>
- [4] KRAUS, Vilém, Zdeněk KUTTELVAŠER a Bohumil VURM. *Encyklopedie českého a moravského vína*. Vyd. 1. Praha: Melantrich, 1997. ISBN 80-702-3250-1.
- [5] KRAUS, Vilém. *Pěstujeme révu vinnou*. 2., aktualiz. a rozš. vyd. Praha: Grada, 2012, 111 s., [16] s. barev. obr. příl. Česká zahrada. ISBN 978-80-247-3465-1.
- [6] PAVLOUŠEK, Pavel a Pavla BUREŠOVÁ. *Vše, co byste měli vědět o víně: ...a nemáte se koho zeptat*. 1. vyd. Praha: Grada, 2015, 140 s. ISBN 978-80-247-4351-6.
- [7] Hibernál. *Vinotéka vínečko* [online]. [cit. 2016-03-14]. Dostupné z: http://www.vinecko.eu/cz-kategorie_377527-0-hibernal.html
- [8] PAVLOUŠEK, Pavel. *Výroba vína u malovinařů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 96 s. ISBN 80-247-1247-4.
- [9] ZEMÁNEK, Pavel a Patrik BURG. *Vinohradnická mechanizace*. Olomouc: Petr Baštan, c2010. ISBN 978-80-87091-14-2.
- [10] STEIDL, Robert. *Sklepní hospodářství*. V českém jazyce vyd. 1. Valtice: Národní salon vín, 2002, 307 s. ISBN 80-903-2010-4.
- [11] STEIDL, Robert a Georg LEINDL. *Cesta ke špičkovému vínu*. 1. vyd. Valtice: Národní salon vín, 2004, 67 s. ISBN 80-903-2014-7.

- [12] Víno. *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. Editor Helena Čížková. 2013 [cit. 2016-03-03]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1006609&docType=ART&nid=11427&chnum=8>
- [13] FLEET, G. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*. 2003-09-01, vol. 86, 1-2, s. 11-22. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00245-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160503002459>
- [14] MEDINA, K., E. BOIDO, L. FARIÑA, et al. Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chemistry* [online]. 2013, 141(3), 2513-2521 [cit. 2016-02-17]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.04.056. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613005025>
- [15] FLEET, Graham H. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research* [online]. 2008, vol. 8, issue 7, s. 979-995 [cit. 2015-12-02]. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x>
- [16] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [17] KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. české vyd. Praha: Galén, c2005. ISBN 80-726-2341-9.
- [18] ROMANO, P. Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2003-09-01, vol. 86, 1-2, s. 169-180 [cit. 2016-01-22]. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00290-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160503002903>
- [19] Chemical gross composition of yeast cell. *Malting and Brewing: Comprehensive resource for malting and brewing* [online]. ©2016 [cit. 2016-03-15]. Dostupné z: <http://maltingandbrewing.com/chemical-gross-composition-of-yeast-cell.html>
- [20] KÖNIG, Helmut, Gottfried UNDEN a Jürgen FRÖHLICH. *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. Berlin: Springer, c2009. ISBN 35-408-5462-2.

- [21] ALEXANDRE, Hervé. Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae*—Their ecology, genetics and metabolism. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2013, vol. 167, issue 2, s. 269-275 [cit. 2014-05-02]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160513004078>
- [22] RIBÉREAU-GAYON, Pascal, Denis DUBOURDIEU, Bernard DONÈCHE a Aline LONVAUD. *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2nd Edition*. Southern Gate, Chichester: John Wiley & Sons, 2006. ISBN 0-470-01034-7.
- [23] RIBÉREAU-GAYON, Pascal, Denis DUBOURDIEU a Bernard DONÈCHE. *Handbook of enology: Volume 2: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, c2006-, 2 v. ISBN 04-700-1037-1.
- [24] PREINER, Darko, Pavica TUPAJIĆ, Jasminka KAROGLAN KONTIĆ, Željko ANDABAKA, Zvezdana MARKOVIĆ a Edi MALETIĆ. Organic acids profiles of the most important Dalmatian native grapevine (*V. vinifera* L.) cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2013, 32(2), 162-168 [cit. 2016-03-05]. DOI: 10.1016/j.jfca.2013.09.005. ISSN 08891575. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157513001191>
- [25] MORENO-ARRIBAS, M a M POLO. *Wine chemistry and biochemistry*. New York: Springer, c2009, xv, 735 p. ISBN 9780387741185-.
- [26] MENDES-FERREIRA, Ana, Catarina BARBOSA, Patrícia LAGE a Arlete MENDES-FAIA. The Impact Of Nitrogen On Yeast Fermentation And Wine Quality. In: *Ciência e técnica vitivinícola* [online]. Dois Portos, 2011 [cit. 2016-02-27]. ISSN 0254-0223. Dostupné z: http://www.scielo.oces.mctes.pt/scielo.php?pid=S0254-02232011000100003&script=sci_arttex
- [27] TUFARIELLO, Maria, Maria A. CHIRIATTI, Francesco GRIECO, et al. Influence of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains on volatile profile of Negroamaro wines. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2014, 58(1), 35-48 [cit. 2016-02-21]. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.03.016. ISSN 00236438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643814001662>

- [28] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin 2*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, xx, 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6
- [29] JANUSZ, Agnieszka, Dimitra L. CAPONE, Carolyn J. PUGLISI, Michael V. PERKINS, Gordon M. ELSEY a Mark A. SEFTON. (E)-1-(2,3,6-Trimethylphenyl)buta-1,3-diene: A Potent Grape-Derived Odorant in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2003, **51**(26), 7759-7763 [cit. 2016-03-05]. DOI: 10.1021/jf0347113. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0347113>
- [30] SCHWAB, Wilfried, Rachel DAVIDOVICH-RIKANATI a Efraim LEWINSOHN. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal* [online]. 2008, vol. 54, issue 4, s. 712-732 [cit. 2014-05-02]. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03446.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-313X.2008.03446.x>
- [31] DZIADAS, Mariusz a Henryk H. JELEŃ. Analysis of terpenes in white wines using SPE–SPME–GC/MS approach. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2010, vol. 677, issue 1, s. 43-49 [cit. 2014-05-02]. DOI: 10.1016/j.aca.2010.06.035. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267010008287>
- [32] PALOMINO, O, M.P GÓMEZ-SERRANILLOS, K SLOWING, E CARRETERO a A VILLAR. Study of polyphenols in grape berries by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2000, 870(1-2), 449-451 [cit. 2016-03-05]. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)01225-X. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196739901225X>
- [33] RODRÍGUEZ MONTEALEGRE, R., R. ROMERO PECES, J.L. CHACÓN VOZMEDIANO, J. MARTÍNEZ GASCUEÑA a E. GARCÍA ROMERO. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2006, 19(6-7), 687-693 [cit. 2016-03-05]. DOI: 10.1016/j.jfca.2005.05.003. ISSN 08891575. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157505000797>
- [34] CARERI, Maria, Claudio CORRADINI, Lisa ELVIRI, Isabella NICOLETTI a Ingrid ZAGNONI. Direct HPLC Analysis of Quercetin and trans -Resveratrol in Red Wine, Grape, and *Winemaking Byproducts*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2003, 51(18), 5226-5231 [cit. 2016-03-05]. DOI: 10.1021/jf034149g. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf034149g>

- [35] Dadáková, E. Vrchotová, N. Tříška, J. Kyseláková, M. Stanovení volného a celkového kvercetinu v moravských červených vínech. *Chem. Listy* 97, 2003, č. 7, s. 558–561
- [36] VITRAC, Xavier, Jean-Pierre MONTI, Joseph VERCAUTEREN, Gérard DEFFIEUX a Jean-Michel MÉRILLON. Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2002, 458(1), 103-110 [cit. 2016-03-05]. DOI: 10.1016/S0003-2670(01)01498-2. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267001014982>
- [37] Totušek J, Vrchotová N, Tříška. J, Marečková L. Resveratrol in red wines from South Moravia wine regions. *Chemické listy* 94, 2000, s. 973-974
- [38] PROCHÁZKOVÁ, Dana. Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analytů. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2002, (96) [cit. 2016-03-13]. ISSN 0009-2770. Dostupné z: <http://chemicke-listy.cz/Bulletin/bulletin334/bulletin334.pdf>
- [39] MLEJOVÁ, Veronika, Petra PAVLÍKOVÁ, Petr DOBIÁŠ, Martin ADAM a Karel VENTURA. Aplikace mikroextrakce tuhou fází pro analýzu bylinných silic. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2010, (104) [cit. 2016-03-13]. ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_03_166-171.pdf
- [40] VUCKOVIC, Dajana, Xu ZHANG, Erasmus CUDJOE a Janusz PAWLISZYN. Solid-phase microextraction in bioanalysis: New devices and directions. *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, vol. 1217, issue 25, s. 4041-4060 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.11.061. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309017403>
- [41] SPME. *Vetrinární a farmaceutická univerzita Brno* [online]. 2012 [cit. 2016-03-13]. Dostupné z: <http://soubory.vfu.cz/fvhe/metoda-spme/>
- [42] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990, 384 s. ISBN 80-030-0569-8.
- [43] CLEMENT, R. *Gas chromatography: biochemical, biomedical, and clinical applications*. New York: Wiley, c1990. ISBN 04-710-1048-0.

- [44] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [45] *Plynová chromatografie: Plynová chromatografie s HiQ® speciálními plyny*. 2009. Dostupné také z: http://www.linde-gas.cz/internet.lg.lg.cze/cs/images/PlynovaChromatogr_4_6_200979_15729.pdf
- [46] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [47] HPLC High Performance Liquid Chromatography. *HPLC.cz* [online]. ©1999-2013 [cit. 2016-03-14]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [48] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [49] WALKER, John M a Ralph RAPLEY. *Molecular biology and biotechnology*. 4th ed. / . Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000. ISBN 0-85404-606-2.
- [50] KRÁLOVÁ, Blanka. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0449-1.
- [51] Genetika zvířat. *Web2.mendelu* [online]. 2016 [cit. 2016-03-16]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1485&typ=html.
- [52] RUML, Tomáš, Michaela RUMLOVÁ a Václav PAČES. *Genové inženýrství*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-708-0499-8.
- [53] SUMATHI, G., G. JEYASEKARAN, R. JEYA SHAKILA, B. SIVARAMAN, G. ARUNKUMAR, U. MANIMARAN a D. SUKUMAR. *Molecular identification of grouper species using PCR-RFLP technique*. *Food Control* [online]. 2015, (vol. 51), 300-306 [cit. 2016-03-15]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.11.026. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713514006604>
- [54] OZGEN, Mustafa, JosephC SCHEERENS, NeilR REESE a RaymondA MILLER. Total phenolic, anthocyanin contents and antioxidant capacity of selected elderberry (*Sambucus canadensis* L.) accessions. *Pharmacogn Mag.* [online]. 2010, 6(23), 198-203 [cit. 2016-04-29]. DOI: 10.4103/0973-1296.66936. ISBN

10.4103/0973-1296.66936. Dostupné z:
<http://www.phcog.com/text.asp?2010/6/23/198/66936>

- [55] RITTICH, Bohuslav, Miroslav ŠPANO a Alena ŠPANOVÁ. *Molekulární identifikace a typizace bakterií mléčného kvašení s využitím shlukové analýzy*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014, 79 s. ISBN 978-80-214-4853-7.
- [56] MELOUN, Milan a Jiří MILITKÝ. *Statistická analýza experimentálních dat*. Vyd. 2. uprav. rozš. Praha: ACADEMIA, 2004, 953 s. ISBN 80-200-1254-0.
- [57] SAMBROOK, Joseph. a David W. RUSSELL. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, c2001. ISBN 08-796-9576-5.
- [58] WELKE, Juliane Elisa, Mauro ZANUS, Marcelo LAZZAROTTO a Cláudia ALCARAZ ZINI. Quantitative analysis of headspace volatile compounds using comprehensive two-dimensional gas chromatography and their contribution to the aroma of Chardonnay wine [online]. [cit. 2016-04-22]. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.02.002. ISBN 10.1016/j.foodres.2014.02.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399691400101X>
- [59] FURDÍKOVÁ, Katarína a Fedor MALÍK. Vplyv kvasiniek na aromatický profil vína. In: *Kvasný průmysl: odborný časopis pro výrobu nápojů a biochemické technologie*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha ve spolupř. se Sahn, s. r. o, 2007, s. 215-221. ISSN 0023-5830.
- [60] MENDES-FERREIRA, Ana, Catarina BARBOSA, Patrícia LAGE a Arlete MENDES-FAIA. The Impact Of Nitrogen On Yeast Fermentation And Wine Quality. In: *Ciência e técnica vitivinícola* [online]. Dois Portos, 2011 [cit. 7.4.2016]. ISSN 0254-0223. Dostupné z: http://www.scielo.oces.mctes.pt/scielo.php?pid=S0254-02232011000100003&script=sci_arttex
- [61] PÉREZ OLIVERO, Sergio J. a Juan P. PÉREZ TRUJILLO. A new method for the determination of short-chain fatty acids from the aliphatic series in wines by headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2011, vol. 696, 1-2, s. 59-66 [cit. 2016-04-07]. DOI: 10.1016/j.aca.2011.03.063. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267011004661>

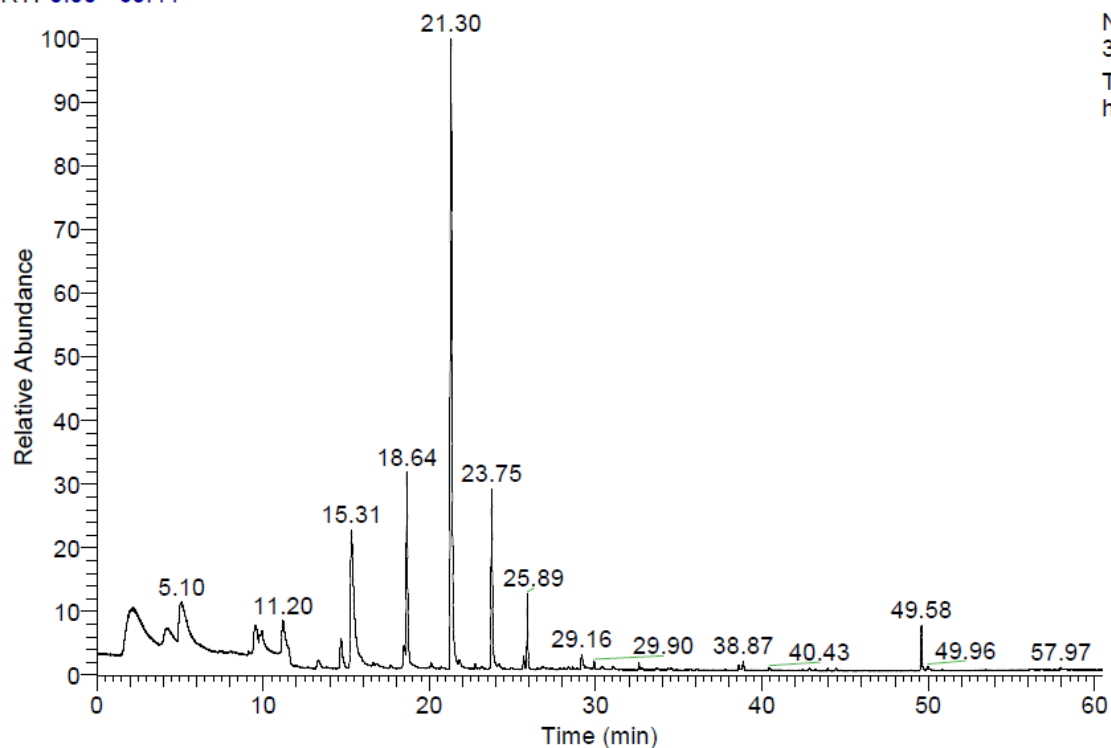
7 POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY

ACE	Aceton
ADE	Acetaldehyd
ATP	Adenosintrifosfát
ADH	Alkoholdehydrogenasa
bp	Počet párů bází
BUT	2,3-butandiol
DI-SPME	Direct immersion solid-phase microextraction (přímá mikroextrakce tuhou fází)
DNA	Deoxyribonukleová kyseliny
dNTP	Deoxynukleotidtrifosfát
DPPH	(2,2-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
ETAC	Ethylacetát
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
EtBr	Ethidium bromid
GC	Gas chromatography (plynová chromatografie)
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry (plynová chromatografie shmotnostní spektrometrií)
HPLC	High Performance Liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
HS-SPME	Headspace solid-phase microextraction (Headspace mikroextrakce tuhou fází)
ISM	Isoamylalkohol
ISB	Isobutanol
° NM	Stupně normovaného moštoměru
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)
PR	n-propanol
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (Polymorfismus délky restrikčních fragmentů)
RNA	Ribonukleová kyseliny
SPME	Solid-phase microextraction (mikroextrakce tuhou fází)
TBE	Trisborát EDTA pufr
TDN	1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaftalen
TPB	4-(2,3,6-trimethylfenyl)buta-1,3-dien
UV	Ultrafialové záření

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Chromatogram GC analýzy, vzorek HIB-0	87
Příloha 2: Chromatogram GC analýzy, vzorek HIB-5	87
Příloha 3: Chromatogram GC analýzy, vzorek RB	88
Příloha 4: Chromatogram GC analýzy, vzorek RB-S	88
Příloha 5: Látky identifikované ve vzorku HIB-0.....	89
Příloha 6: Látky identifikované ve vzorku HIB-1.....	90
Příloha 7: Látky identifikované ve vzorku HIB-2.....	91
Příloha 8: Látky identifikované ve vzorku HIB-3.....	92
Příloha 9: Látky identifikované ve vzorku HIB-4.....	93
Příloha 10: Látky identifikované ve vzorku HIB-5.....	94
Příloha 11: Látky identifikované ve vzorku HIB-6.....	95
Příloha 12: Látky identifikované ve vzorku RB	96
Příloha 13: Látky identifikované ve vzorku RB-S	97
Příloha 14: Chromatogram-kalibrace sacharidů 200 mg·l ⁻¹ , 1-fruktóza, 2-glukóza, 3-sacharóza	98
Příloha 15: Chromatogram stanovení sacharidů-vzorek HIB-1, 1-fruktóza, 2-glukóza	98
Příloha 16: Chromatogram stanovení kyselin-vzorek HIB-1, 1-kyselina citronová, 2-kyselina vinná, 3-kyselina octová	99
Příloha 17: Graf kalibrační křivky kyseliny jantarové	99
Příloha 18: Graf kalibrační křivky kyseliny jablečné.....	100
Příloha 19: Graf kalibrační křivky kyseliny máselné	100
Příloha 20: Elektroforeogram PCR produktů získaný amplifikací 5,8S-ITS oblastí izolovaných kvasinek. S100-délkový standard 100 bp, čísla 9,10,14-označení vzorků	101
Příloha 21: Elektroforeogram restričních fragmentů získaných štěpením PCR produktu restriční endonukleázou HaeII. S100-délkový standard 100 bp, 14, 10, 9-označení vzorků	101
Příloha 22: Elektroforeogram restričních fragmentů získaných štěpením PCR produktu restriční endonukleázou HinfI. S100-délkový standard 100 bp, 14, 10, 9, 2-označení vzorků	102
Příloha 23: Elektroforeogram restričních fragmentů získaných štěpením PCR produktu restriční endonukleázou HhaI. S100-délkový standard 100 bp, 14, 10, 9-označení vzorků	102
Příloha 24: Elektroforeogram restričních fragmentů získaných štěpením PCR produktu restriční endonukleázou TaqI ^a . S100-délkový standard 100 bp, 10, 9-označení vzorků	103

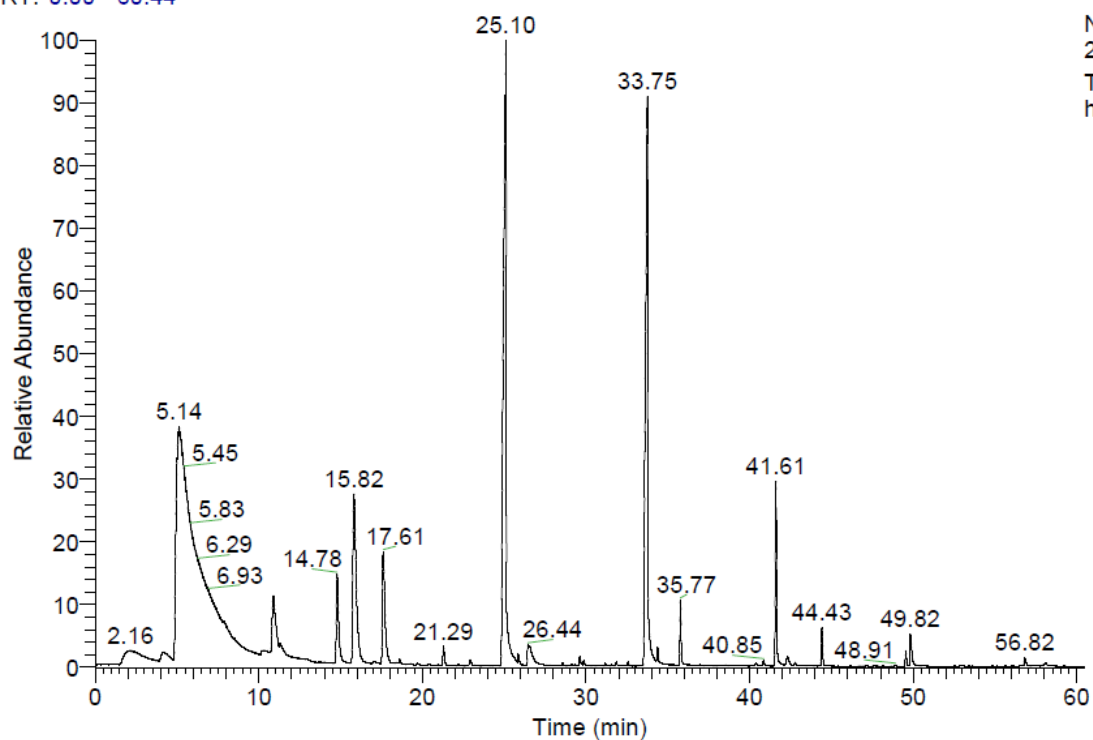
RT: 0.00 - 60.44



NL:
3.47E8
TIC MS
hib0

Příloha 1: Chromatogram GC analýzy, vzorek HIB-0

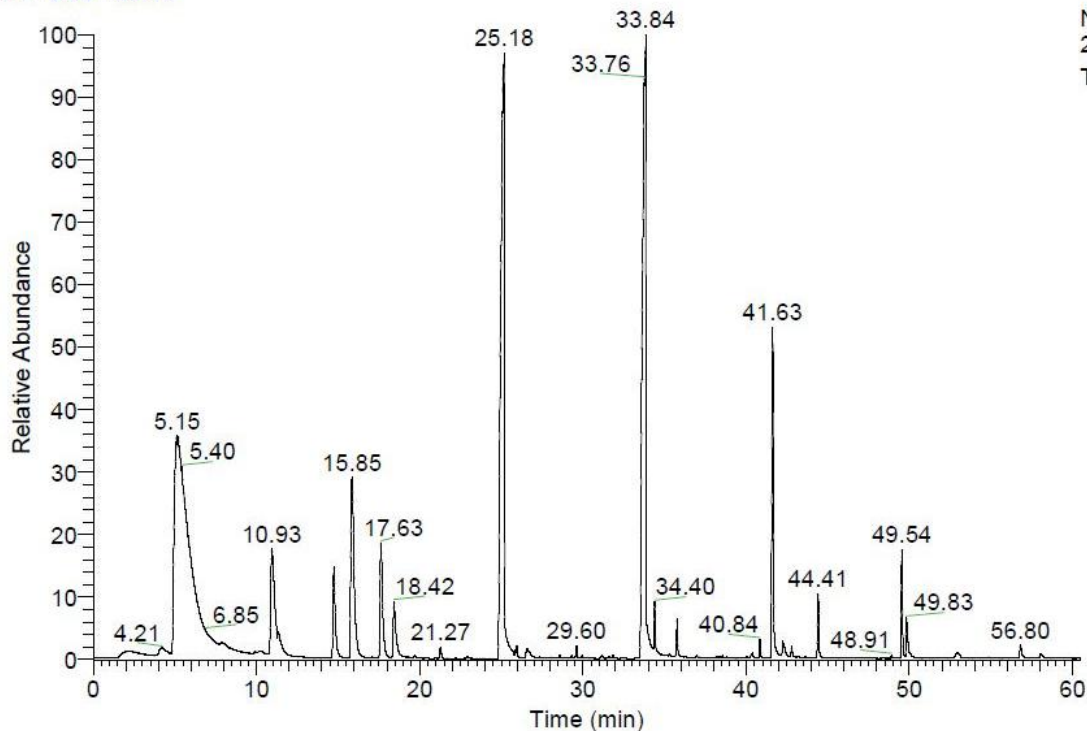
RT: 0.00 - 60.44



NL:
2.35E9
TIC MS
hib5

Příloha 2: Chromatogram GC analýzy, vzorek HIB-5

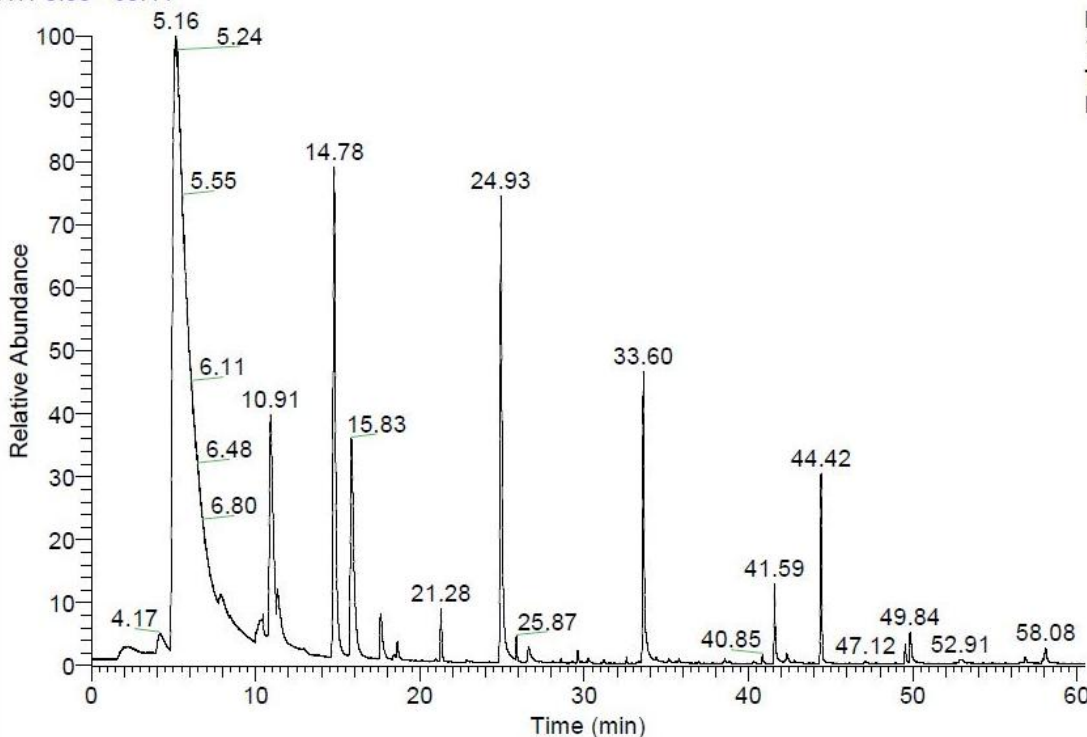
RT: 0.00 - 60.46



NL:
2.50E9
TIC MS RB

Příloha 3: Chromatogram GC analýzy, vzorek RB

RT: 0.00 - 60.44



NL:
1.06E9
TIC MS
RBA

Příloha 4: Chromatogram GC analýzy, vzorek RB-S

Příloha 5: Látky identifikované ve vzorku HIB-0

Identifikované látky	Retenční čas
Kyslík	2,20
Ethylacetát	4,22
Ethanol	5,10
Hexanal	9,51
Dekamethylcyklopentasiloxan	11,20
3-methylbutan-1-ol	14,67
(E)-2-hexenal	15,31
Oktanal	18,46
3TMS derivát kyseliny fosfonoctové	18,64
(Z)-2-heptenal	20,10
Hexan-1-ol	21,30
Methansulfinylfluorid	21,81
2-pentyn-4-on	22,76
(Z)-2-hexen-1-ol	23,75
1-okten-3-ol	25,67
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadecamethyl-oktasiloxan	25,89
Kyselina octová	26,80
TBDMS derivát isovanillinu	28,09
(E)-2-hepten-1-ol	28,35
2TMS derivát kyseliny 3-hydroxybenzoové	28,60
Benzaldehyd	29,18
Linalool	29,90
3TMS derivát kyseliny fosfonoctové	30,40
Dimethylsulfoxid	31,03
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tetradecamethylheptasiloxan	32,60
Ethyldekanoát	33,63
4-ethylbenzaldehyd	34,38
2-nonanol	34,54
α -terpinylacetát	36,08
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tetradecamethylheptasiloxan	38,61
2,5-dimethylhexan-2,5-diol	38,87
2-tridekanon	40,43
Ethyl-oktanoát	42,83
Benzylalkohol	43,21
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11-dodecamethylhexasiloxan	43,96
2-fenylethylalkohol	44,46
1-(1-hydroxy-1-heptyl)-2-methylene-3-pentylcyklopropan	49,58
Kyselina oktanová	49,96
2,4-ditertbutylfenol	57,97

Příloha 6: Látky identifikované ve vzorku HIB-1

Identifikované látky	Retenční čas
(2-Aziridinyethyl)amine	2,19
Ethylacetát	4,22
Acetaldehyd	4,89
Ethanol	5,05
Ethylbutanoát	7,94
Hydrazid kyseliny octové	9,88
Isoamylacetát	11,13
3-methylbutanol	14,67
Ethylhexanoát	15,92
Styren	17,11
Hexylacetát	17,70
Oktanal	18,48
4-hexen-1-ol acetát	19,33
4-hexen-1-yl hexanoát	19,33
Ethylheptanoát	20,42
1-hexanol	21,29
Heptylacetát	22,26
Methyloktanoát	22,99
Ethylloktanoát	25,17
Isopentylhexanoát	25,98
Kyselina octová	26,55
Nonyloktanoát	28,64
Benzaldehyd	29,16
Linalool	29,90
Methyldekanoát	31,89
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tetradecamethylheptasiloxan	32,60
Ethyldekanoát	33,72
Isoamylloktanoát	34,41
9-ethyldekanoát	35,84
N,N-dihexyl-2-(2-thiophenyl)ethylamin	36,33
Methyldodekanoát	40,12
2-tridekanon	40,44
2-fenylethylacetát	40,90
Ethylododekanoát	41,64
Kyselina hexanová	42,37
2-oktyloktanoát	42,82
Fenylethanol	44,46
Kyselina oktanová	49,87
Kyselina dekanová	56,87

Příloha 7: Látky identifikované ve vzorku HIB-2

Identifikované látky	Retenční čas
(2-Aziridinylethyl)amine	2,19
Ethylacetát	4,2
Acetaldehyd	4,8
Ethanol	5,1
Ethylbutanoát	8,08
cis-2-methyl-3-tetrahydro-furanthiol	9,89
Isoamylacetát	11,1
Methylacetát	13,87
3-methylbutanol	14,69
Ethylhexanoát	15,92
Kyselina fenylbutandiová	17,12
Hexylacetát	17,7
Oktanal	18,52
Cyklohexylhexanoát	19,74
Ethylheptanoát	20,42
1-hexanol	21,29
Heptylacetát	22,26
Methyloktanoát	22,99
Ethylloktanoát	25,19
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadecamethyloctasiloxan	25,88
Isopentylhexanoát	25,98
Kyselina octová	26,56
Nonadecan	27,36
Propyloktanoát	28,62
Benzaldehyd	29,17
Ethylnonanoát	29,35
2,3-butandiol	29,63

Linalool	29,9
Isobutyloktanoát	29,99
Pentylcyklopropan	30,3
Hexadecan	31,63
Methyldekanoát	31,89
Hexylhexanoát	32,45
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tetradecamethylheptasiloxan	32,59
Ethyldekanoát	33,75
Isoamylloktanoát	34,41
9-ethyldekanoát	35,82
Karbohydrazid	36,32
Methyldodekanoát	40,11
2-tridekanon	40,42
2-fenylethylacetát	40,89
Ethyldekanoát	41,63
Kyselina pentanová	42,34
2-oktyloktanoát	42,82
Fenylethanol	44,45
2-ethyl-4,5-dihydro-4-methyl-1H-imidazol	46,17
1-(1-hydroxy-1-heptyl)-2-methylene-3-pentylcyklopropan	49,58
Kyselina oktanová	49,85
Kyselina undekanová	52,64
Kyselina nonanová	53,44
N-acetyl-N-benzoylglukosamin	54,1
Kyselina dekanová	56,86

Příloha 8: Látky identifikované ve vzorku HIB-3

Identifikované látky	Retenční čas
(2-Aziridinylethyl)amine	2,19
Ethylacetát	4,20
Acetaldehyd	4,82
Ethanol	5,09
Ethylbutanoát	7,94
hydrazid kyseliny octové	9,89
Isoamylacetát	11,16
3-methylbutanol	14,68
Ethylhexanoát	15,91
N-Methoxy-N-hydroxymethyl-N-methylamine	16,86
Styren	17,10
Hexylacetát	17,68
2-ethylcyklohexanol	18,46
Oktanal	18,61
Methansulfinylfluorid	19,32
Cyklohexylacetát	19,75
Ethylheptanoát	20,44
1-hexanol	21,29
Heptylacetát	22,26
Methyloktanoát	22,98
Ethylloktanoát	25,21
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadecamethyloctasiloxan	25,88
2-methylbutylohexanoát	25,98
Kyselina octová	26,48
Tetradecan	27,37
Propylloktanoát	28,63
Benzaldehyd	29,16
Ethylnonanoát	29,36
2,3-butandiol	29,62
Linalool	29,90
Isobutylloktanoát	29,99

Hexadecan	31,63
Methyldekanoát	31,89
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tetradecamethylheptasiloxan	32,59
Ethyldekanoát	33,80
Isoamylloktanoát	34,42
9-ethyldekanoát	35,82
{3-Pyridinecarboxamide, N-phenyl-]Nicotinamide	36,32
4-ethyldekanoát	37,00
Isobutyl-2,6-difluoro-3-methylbenzoát	38,21
trans-1,3-dimethylsilacyclohexan	38,85
Methyl- α -D-glukopyranosiduronát	40,11
2-tridekanon	40,43
2-fenylethylacetát	40,89
Ethylododekanoát	41,64
Kyselina hexanová	42,34
2-oktyloktanoát	42,82
Methyl-cis-5-dodekanoát	43,26
Fenylethylalkohol	44,45
1-dodekanol	46,16
(z)-ethylpentadec9-enoat	43,64
Methyltetradekanoát	47,63
Fenol	47,98
Ethyltetradekanoát	48,95
1-(2-methylen-3-pentylcyklopropyl)-1-heptanol	49,57
Kyselina oktanová	49,87
Ethyl-9-tetradekanoát	50,28
5-hydroxymethylfurfural	53,10
Kyselina dekanová	56,86

Příloha 9: Látky identifikované ve vzorku HIB-4

Identifikované látky	Retenční čas
(2-Aziridinylethyl)amine	2,34
Ethylacetát	4,18
Acetaldehyd	4,86
Ethanol	5,14
Ethylbutanoát	7,89
Kyslík	10,3
Hydrazid kyseliny octové	10,58
Isoamylacetát	10,9
p-xylen	11,58
3-methylbutanol	14,77
Ethylhexanoát	15,77
Styren	16,99
1,3,5,7-cyklooktatetraen	17,15
Hexylacetát	17,58
Oktanal	18,38
Hex-4-yn-3-on	19,27
Ethylchlorofluoroacetát	19,67
Ethylheptanoát	20,37
1-hexanol	21,28
Heptylacetát	22,23
Methyloktanoát	22,93
Ethyloktanoát	25,12
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadecamethyloctasiloxan	25,86
Kyselina octová	26,45
2TMS derivát kyseliny 4-hydroxybenzoové	28,58
Benzaldehyd	29,14
Ethylnonanoát	29,3
2,3-butandiol	29,61
Linalool	29,87
Hexadekan	31,59

Methyldekanoát	31,85
Hexylhexanoát	32,41
3TMS derivát kyseliny 2,6-dihydroxybenzoát	32,57
Ethyldekanoát	33,74
Isoamyl oktanoát	34,38
9-ethyldekanoát	35,75
Karbohydrazid	36,29
Cyklohexyl-2,6-difluoro-3-methylbenzoát	36,97
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadecamethyloktasiloxan	38,57
Methyl- α -D-glukopyranosiduronát	40,09
2-tridekanon	40,4
2-fenylethylacetát	40,86
Ethyl dodekanoát	41,61
Kyselina hexanová	42,33
1-methylheptyloktanoát	42,78
Fenylethylalkohol	44,42
N-allylcaprolaktam	46,13
Methyltetradekanoát	47,59
Ethyltetradekanoát	48,91
1-(2-methylen-3-pentylcyklopropyl)-1-heptanol	49,54
Kyselina oktanová	49,83
5-hydroxymethylfurfural	53,04
Methyldiethanolamin	53,7
Kyselina dekanová	56,82
Glycerol	58,03

Příloha 10: Látky identifikované ve vzorku HIB-5

Identifikované látky	Retenční čas
(2-Aziridinylethyl)amine	2,16
Ethylacetát	4,20
Acetaldehyd	4,89
Ethanol	5,14
Methanol	10,28
Isoamylacetát	10,89
3-methylbutanol	14,78
Ethylhexanoát	15,82
Styren	17,05
Hexylacetát	17,61
2-ethylcyklohexanol	18,41
3TMS derivát kyseliny fosfonooctové	18,60
cis-3-hexenylacetát	19,27
4-hexen-1-yl-hexanoát	19,68
Ethylheptanoát	20,35
1-hexanol	21,29
Heptylacetát	22,20
Methyloktanoát	22,93
Ethyloktanoát	25,10
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-dodecamethylhexasiloxan	25,86
Kyselina octová	26,64
TBDMS derivát isovanillinu	28,08
2TMS derivát kyseliny 4-hydroxybenzoové	28,58
Benzaldehyd	29,13

Ethylnonanoát	29,31
2,3-butandiol	29,62
Linalool	29,87
Hexadekan	31,58
Methyldekanoát	31,84
Ethyldekanoát	33,75
Isoamyloktanoát	34,38
9-ethyldekanoát	35,77
3methyl-5-nitrofenol	36,28
3-(methylthio)-1-propanol	36,97
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tetradecamethylheptasiloxan	38,57
Methyldodekanoát	40,08
2-tridekanon	40,39
2-fenylethylacetát	40,85
Ethyldekanoát	41,61
Kyselina hexanová	42,31
2-oktyloktanoát	42,78
Fenylethylalkohol	44,43
2,5-furandicarboxaldehyd	47,12
Ethyltetradekanoát	48,91
1-(2-methylen-3-pentylcyklopropyl)-1-heptanol	49,55
Kyselina oktanová	49,82
Kyselina dekanová	56,58
Glycerol	58,09

Příloha 11: Látky identifikované ve vzorku HIB-6

Identifikované látky	Retenční čas
(2-Aziridinylethyl)amine	2,17
Ethylacetát	4,17
Acetaldehyd	4,90
Ethanol	5,05
Ethybutyrát	7,80
Isobutanol	9,72
Isoamylacetát	10,85
3-methylbutanol	14,27
Ethylhexanoát	15,38
Styren	16,53
Hexylacetát	17,07
Dodekamethylcoklohexasiloxan	18,02
1-hexanol	20,53
Methyloktanoát	22,10
Nonanal	22,31
Ethyloktanoát	23,97
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadecamethyloktasiloxan	25,06
Kyselina octová	25,54
2,3-butandiol	28,38
Linalool	28,65
Undekan-2-on	30,64
3,7-dimethyl-1,5,7-oktatrien-3-ol	31,19
Ethyldekanoát	21,15
Benzaldehyd	32,61
Isoamyloktanoát	32,87
3-methylbutanoát	33,98
9-ethyldekanoát	34,18
α -terpineol	34,47
2-fenylethylacetát	38,91
Ethyl-dodekanoát	39,67
Kyselina hexanová	40,44
Fenylethylalkohol	42,28
Kyselina oktanová	47,52
3-methylbutanoát	48,38
Pentylpentanoát	49,38
Kyselina benzoová	51,05
2-Methoxy-4-vinylphenol	51,55
Kyselina dekanová	54,02
2,4-ditertbutylpenol	54,92

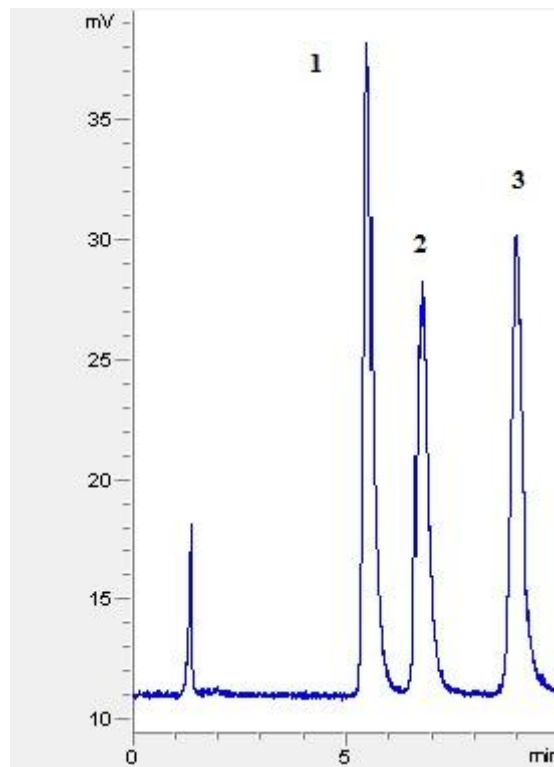
Příloha 12: Látky identifikované ve vzorku RB

Identifikované látky	Retenční čas
(2-Aziridinylethyl)amine	2,14
Ethylacetát	4,21
Acetaldehyd	4,86
Ethanol	5,15
Ethylbutanoát	7,88
Isoamylacetát	10,93
3-methylbutanol	14,75
Ethylhexanoát	15,85
Styren	17,05
Hexylacetát	17,63
Octanal	18,42
2-pentyn-4-on	19,28
(Z)-3-hexen-1-ol acetát	19,69
(Z)-dimethyl-2-butenedioát	20,36
n-pentylmethylfosfonofluorodát	20,95
1-hexanol	21,27
Heptylacetát	22,21
Methyloktanoát	22,94
Ethyloktanoát	25,18
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadecamethyloktasiloxan	25,85
Isopentylhexanoát	25,94
Kyselina octová	26,59
TBDMS derivát vanillinu	28,07
Ethylnonanoát	29,31
Benzaldehyd	29,14
Linalool	29,85
Isobutyloktanoát	29,95
1-oktanol	30,26
2,3-butandiol	31,16

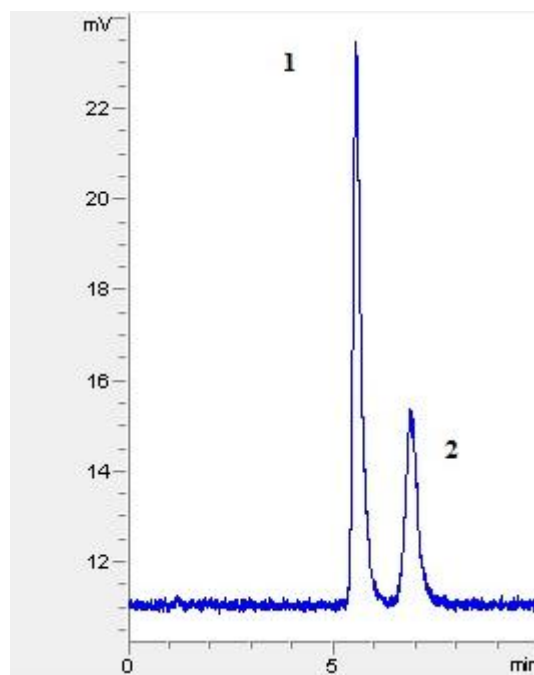
Hexadekan	31,60
Methyldekanoát	31,85
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tetradecamethylheptasiloxan	32,55
Ethyldekanoát	33,83
Isoamyloktanoát	34,40
Decylacetát	35,30
9-ethyldekanoát	35,77
Propyldekanoát	36,97
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tetradecamethylheptasiloxan	38,55
2-tridekanon	40,38
2-fenylethylacetát	40,84
Ethyldekanoát	41,63
4-hydroxy-2-methylacetofenon	42,03
3-methylbutylpentadekanoát	42,25
2-ethylhexyloktanoát	42,79
9-ethylhexadekanoát	43,22
(Z)-ethylpentadekanoát	43,61
Fenylethylalkohol	44,41
Methyltetradekanoát	47,60
Ethyltetradekanoát	48,91
1-(1-hydroxy-1-heptyl)-2-methylene-3-pentylcyklopropan	49,54
Kyselina oktanová	49,83
5-hydroxymethylfurfural	52,95
Kyselina dekanová	56,80
Ethylhexadekanoát	55,64
2,4-ditertbutylfenol	57,92
Glycerol	58,07

Příloha 13: Látky identifikované ve vzorku RB-S

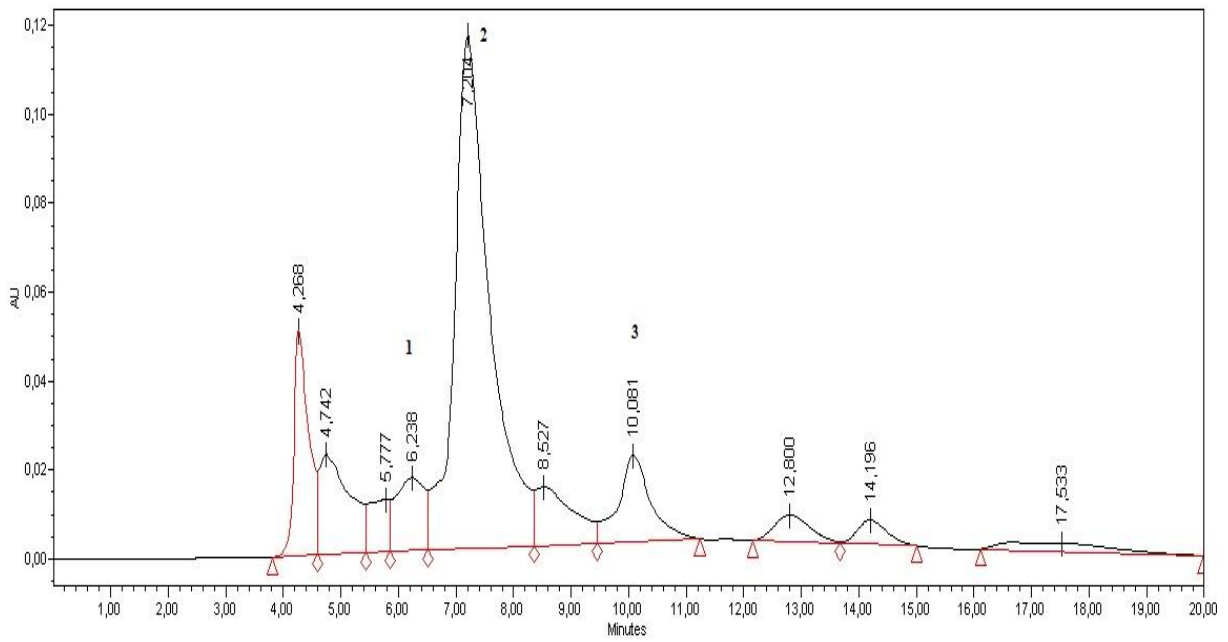
Identifikované látky Vzorek RB-S	Retenční čas		
Hydrazinkarboxamid	2,27	1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tetradecamethylheptasiloxan	32,57
Ethylacetát	4,17	Ethyldekanoát	33,60
Acetaldehyd	4,87	1,3-diethoxy-1,1,3,3-tetramethyldisiloxan	35,15
Ethanol	5,16	Diethylbutandioát	35,28
Ethylbutanoát	7,90	3-methylpentanoát	35,59
Isobutanol	10,46	9-ethyldekanoát	35,77
Isoamylacetát	10,91	3-(methylthio)-1-propanol	36,97
3-methylbutanol	14,78	Kyselina acetoxyhydroxamová	37,78
Ethylhexanoát	15,83	1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tetradecamethylheptasiloxan	38,57
Hexylacetát	17,61	2,5-dimethyl-2,5-hexandiol	38,83
Octanal	18,42	4-O-methylmannosa	40,31
3TMS derivát kyseliny fosfonooctové	18,63	2-fenylethylacetát	40,85
2-ethylhexenoát	20,96	Ethyldekanoát	41,59
1-hexanol	21,28	Kyselina hexanová	42,33
3-methylcyklopenten	21,80	2-oktyloktanoát	42,79
Kyseliny 17-oktadecynová	23,16	Benzylalkohol	43,17
Hydrazin	24,23	Fenylethylalkohol	44,42
Ethylloktanoát	24,93	2,5-furandikarboxaldehyd	47,12
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadecamethyloktasiloxan	25,87	1-(1-hydroxy-1-heptyl)-2-methylene-3-pentylcyklopropan	49,54
Furfural	26,62	Kyselina oktanová	49,84
2-ethyl-1-hexanol	27,35	5-hydroxymethylfurfural	52,91
TBDMS derivát isovanillinu	28,07	Kyselina dekanová	56,84
2TMS derivát kyseliny 3-hydroxybenzoové	28,58	2,4-ditertbutylfenol	57,92
Benzaldehyd	29,21	Glycerol	58,08
2,3-butandiol	29,61		
Linalool	29,87		
1-oktanol	30,26		



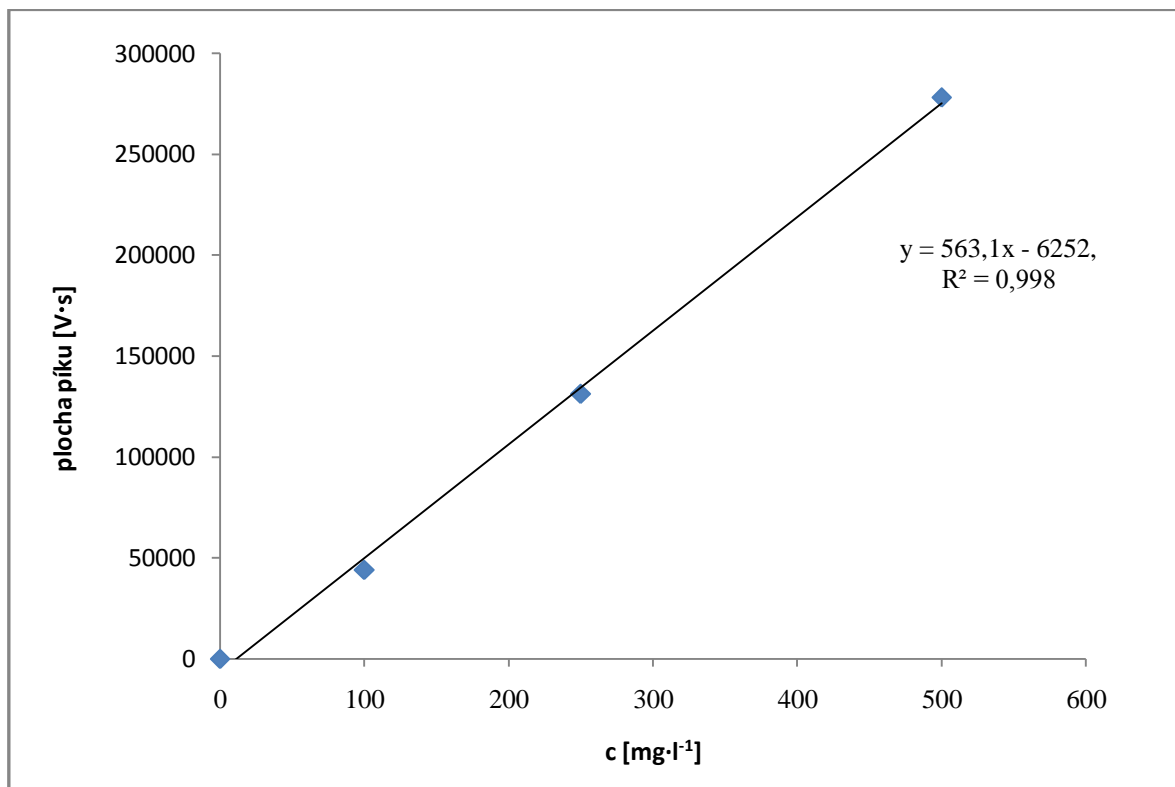
Příloha 14: Chromatogram-kalibrace sacharidů 200 mg·l⁻¹, 1-fruktóza, 2-glukóza, 3-sacharóza



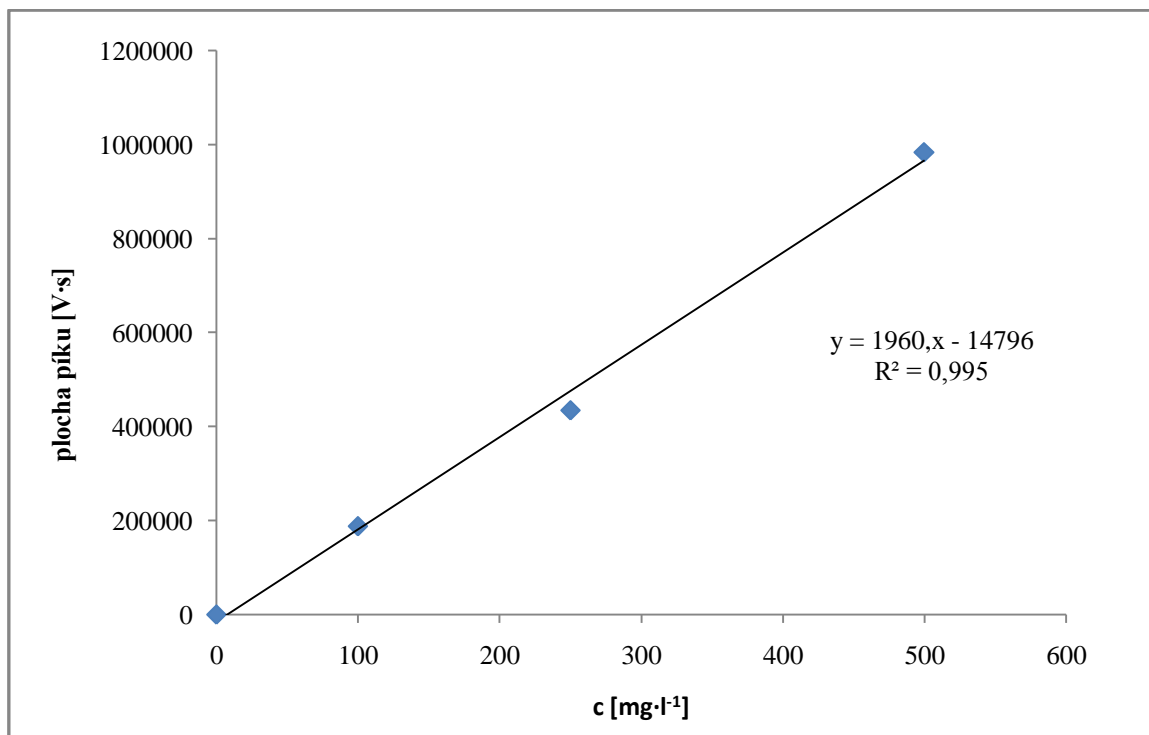
Příloha 15: Chromatogram stanovení sacharidů-vzorek HIB-1, 1-fruktóza, 2-glukóza



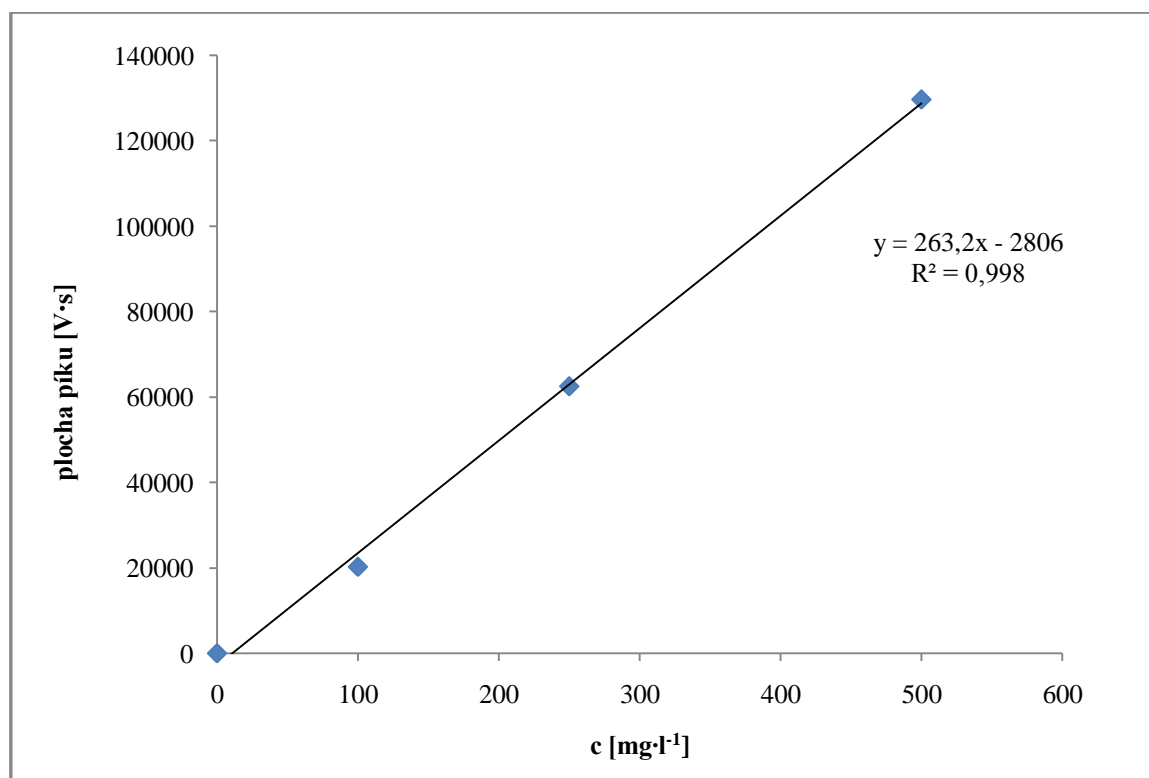
Příloha 16: Chromatogram stanovení kyselin-vzorek HIB-1, 1-kyselina citronová, 2-kyselina vinná, 3-kyselina octová



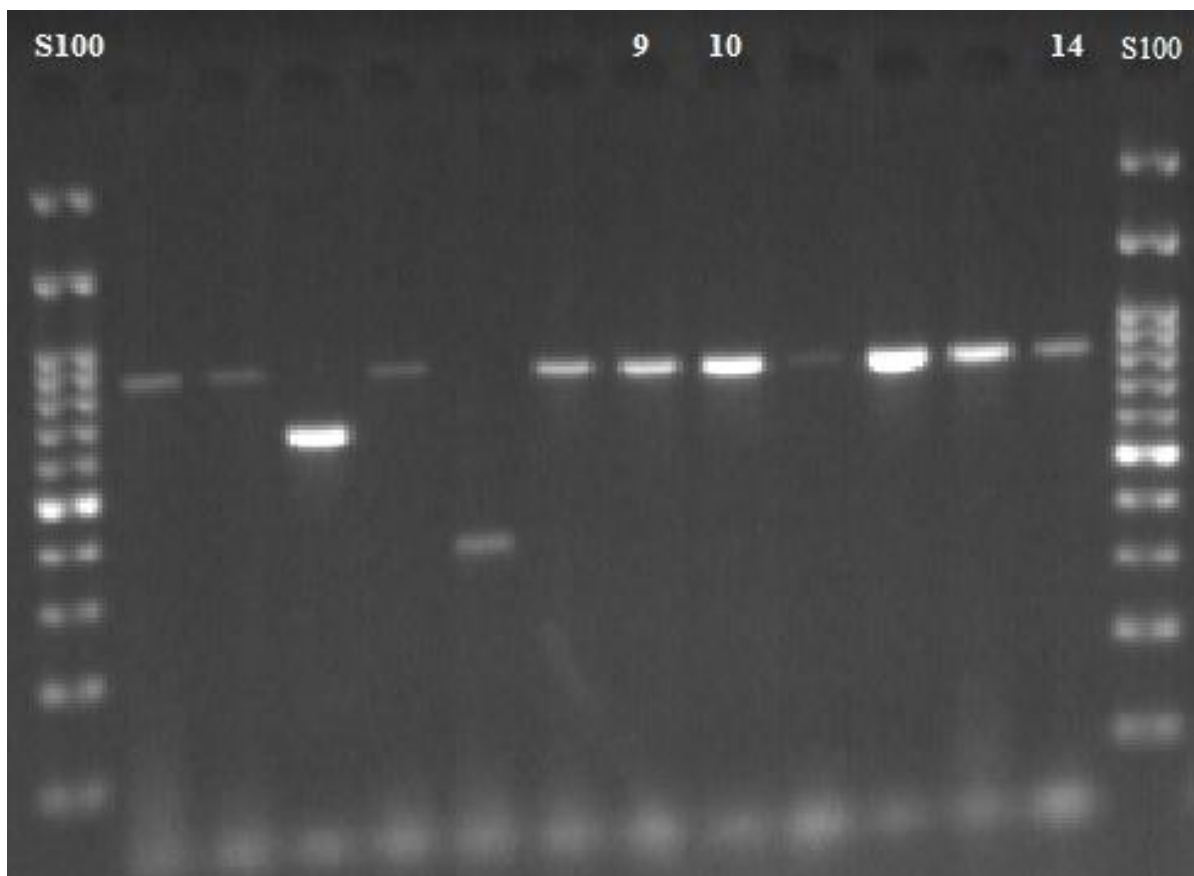
Příloha 17: Graf kalibrační křivky kyseliny jantarové



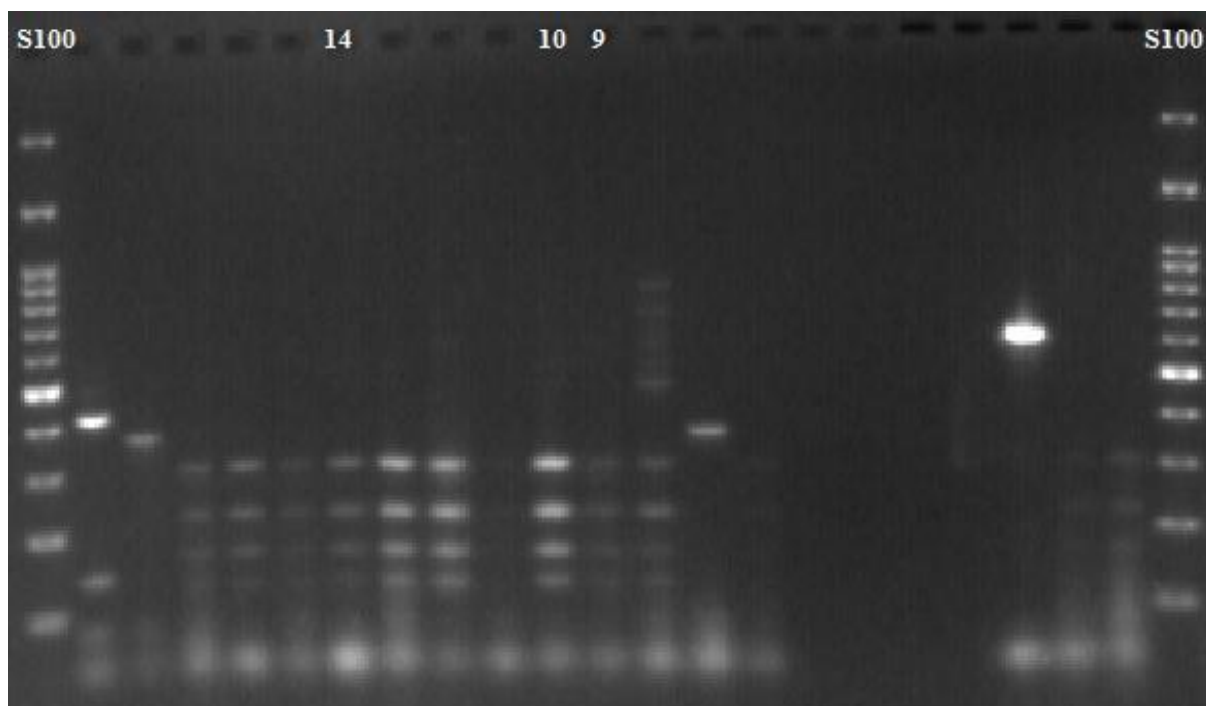
Příloha 18: Graf kalibrační křivky kyseliny jablečné



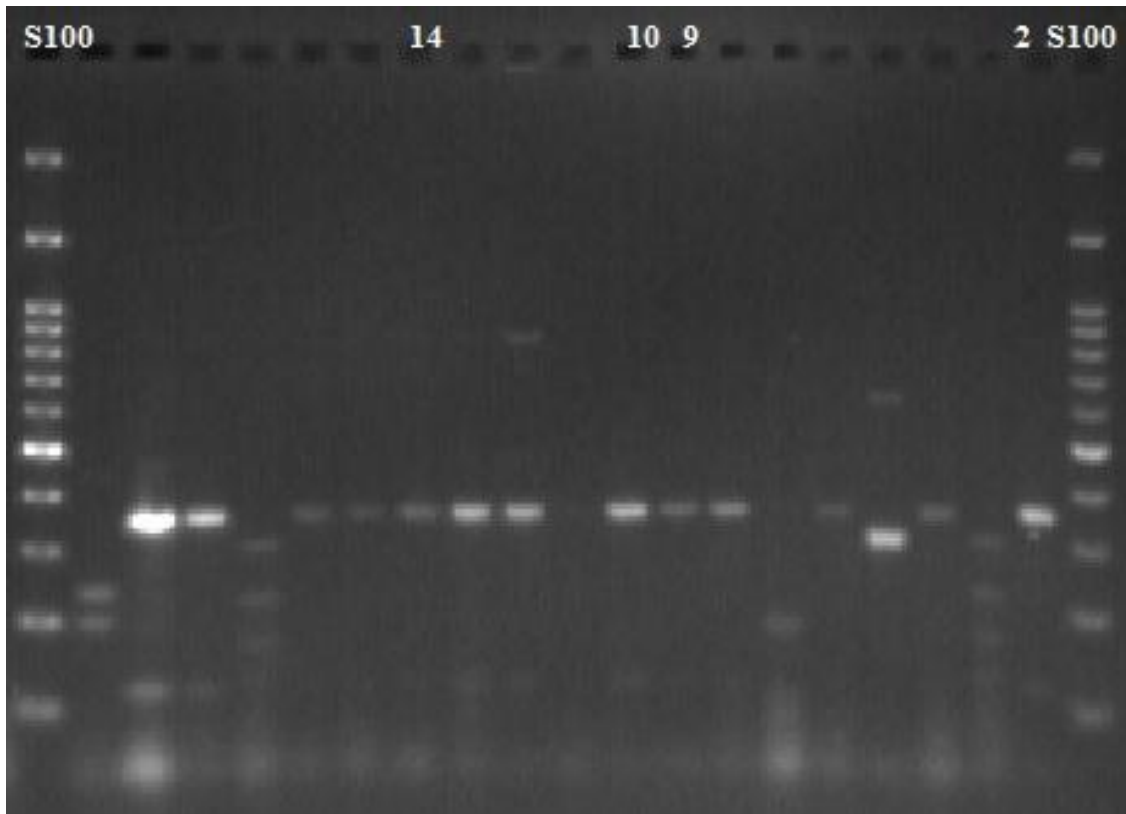
Příloha 19: Graf kalibrační křivky kyseliny máselné



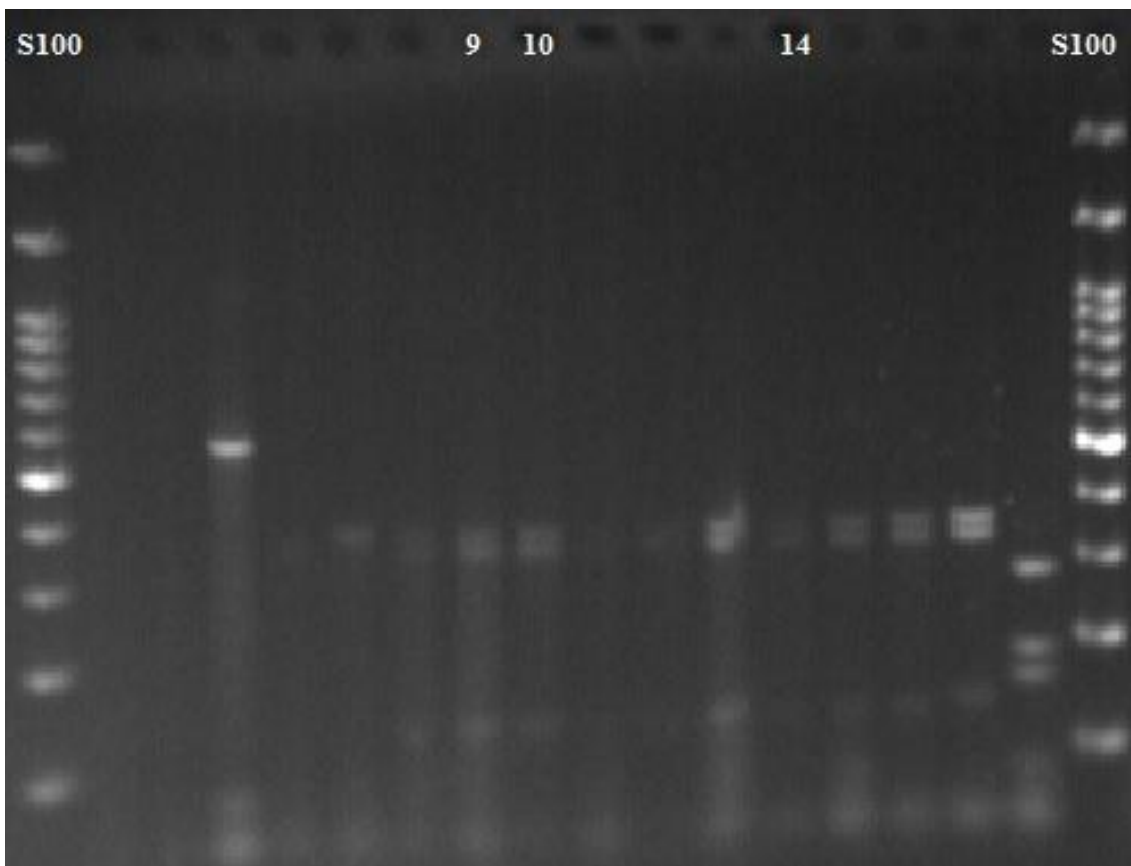
Příloha 20: Elektroforeogram PCR produktů získaný amplifikací 5,8S-ITS oblastí izolovaných kvasinek. S100-délkový standard 100 bp, čísla 9,10,14-označení vzorků



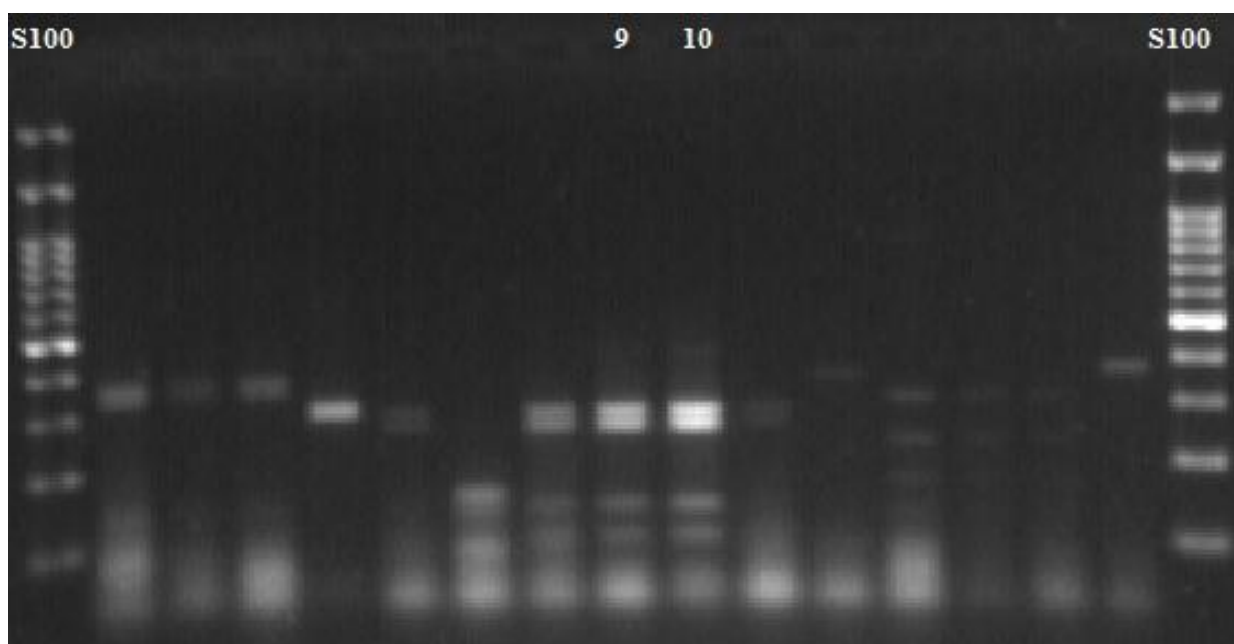
Příloha 21: Elektroforeogram restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou HaeII. S100-délkový standard 100 bp, 14, 10, 9-označení vzorků



Příloha 22: Elektroforeogram restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *HinfI*. S100-délkový standard 100 bp, 14, 10, 9, 2-označení vzorků



Příloha 23: Elektroforeogram restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *HhaI*. S100-délkový standard 100 bp, 14, 10, 9-označení vzorků



Příloha 24: Elektroforeogram restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *TaqI*^a. S100-délkový standard 100 bp, 10, 9-označení vzorků