

Identifikace zákalů přírodních lahvových vín

VLADIMÍR BENEŠ, Výzkumné pracoviště Vinařských závodů, n. p., Praha

663.257/258

Problematika zákalů přírodních lahvových vín je v československém vinařském průmyslu stále živá. Různé druhy těchto zákalů, podmínky, za kterých se tvoří a prevence proti jejich vzniku byly již v Kvasném průmyslu [1] popsány. Úkolem tohoto článku je, popsat analytický postup, podle kterého lze jednotlivé druhy zákalů od sebe rozlišit. Tento postup byl prakticky vyzkoušen a prověřen ve Výzkumném pracovišti Vinařských závodů, n. p., v Praze při analýzách zakalených vín, jež jsou pracovišti zasílána výrobními závody.

Jako základního pramene při výběru vhodných analytických metod bylo použito práce *Tannera* a *Vetsche* [2], některé speciální metody, např. stanovení tříslovin z korků a stanovení bílkovin, byly převzaty z novějších prací *Burkhardta* a *Kocha* [7, 6]. Soustavný analytický postup byl vypracován s ohledem na rozdělení zákalů, jak je uvedeno v dřívější práci [1].

Analýza zákalů přírodního lahvového vína se řídí charakterem vysrážených sloučenin a množstvím komponent, tvořících zákal. Zákal nejsou tvořeny vždy pouze jednou složkou, nýbrž většinou se vyskytují v různých kombinacích: zákal biologické a fyzikální, třísloviny s bílkovinami, kovy či barvivy, bílkoviny s kovy a sírou, krystalické zákal s barvivy apod.

Identifikovat zákal, vzniklé z několika komponent je časově náročnější, než určit zákal jednoduché a předpokládá to jistou zkušenost analytika. Proto je třeba, aby byl při identifikaci dodržován určitý systém, tj. jednotný analytický postup, který umožňuje za použití fyzikálních a chemických zkoušek rozlišit jednotlivé typy zákalů a určit látky, jež jsou jejich původci. Schéma analytického postupu ukazuje obr. 1.

Základem těchto zkoušek je mikroskopické vyšetření, kterým se zjistí, je-li zákal způsoben mikroorganismy, krystalickými nebo amorfními látkami. Amorfní látky lze pak rozdělit podle spalitelnosti na látky organické, anorganické nebo sloučeniny a směsi obou. Tak je možno analyticky rozdělit zákal na několik skupin, v nichž se dále zjistí specifickými zkouškami přítomnost jednotlivých látek, kationtů, aniontů a chemických prvků.

Vlastní postup

A. Zákal se posoudí makroskopicky před otevřením láhve s vínem.

B. Vzorek zakaleného vína se odstředí v elektrické odstředivce, promyje 10% alkoholem, opět odstředí a sraženina pozoruje pod mikroskopem.

C. Podle mikroskopického vyšetření se dělí látky, které jsou příčinou zákalů, na:

1. Mikroorganismy.
2. Krystalické látky.
3. Amorfní látky.
4. Jiné látky tvarově různě vyhraněné.

Jsou-li přítomny mikroorganismy, určí se, zda jde o kvasinky, bakterie nebo plísně. Jsou-li přítomny bakterie, provádí se barvení podle *Gramma* (diferenciace na *Gramm* + a *Gramm* -), čímž se zjistí, jde-li o bakterie mléčné či octové.

Zjistí-li se mikroskopickou zkouškou přítomnost krystalických látek, provedou se další zkoušky na vinný kámen a vinnan vápenatý. V přítomnosti síranu vápenatého se obvykle další zkoušky neprovádějí, neboť jeho krystaly jsou tak charakteristické, že další identifikace bývá zbytečná.

Zjistí-li se při mikroskopickém vyšetřování přítomnost amorfních látek, připraví se spodogram a zjistí se, zda jde o látky spalitelné, částečně spalitelné nebo nespalitelné.

a) Za látky spalitelné se považují takové, které při žhání zuhelňují a po delším žhání zanechávají nepatrný zbytek ve formě popela.

Zjistí-li se, že jsou přítomny spalitelné látky, jde o látky organického původu a usuzuje se na přítomnost bílkovin, tříslovin, barviv, celulózy; (parafin vytéká beze zbytku).

b) Jako částečně spalitelné se posuzují takové látky, jež při žhání částečně zuhelňují a zanechávají větší množství popela. Zjistí-li se jejich přítomnost, usuzuje se na kombinovaný zákal.

c) V případě, že se sraženina nezuheľňuje a *ne-spaluje se*, jsou přítomny látky anorganické (FePO_4 , Cu_2SO_3).

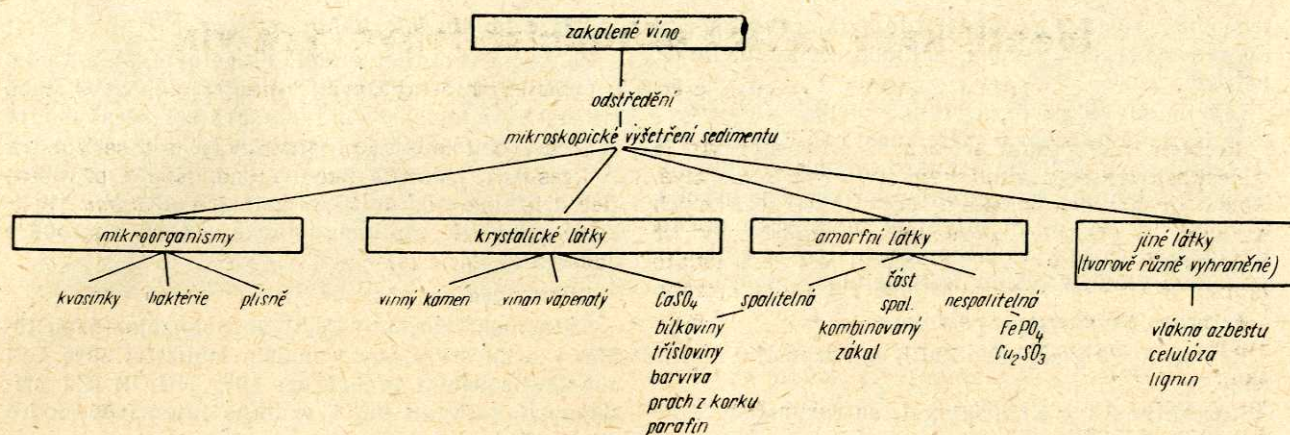
Do skupiny látek tvarově různě vyhraněných se řadí kromě mechanických nečistot také celulóza, azbest a lignin.

Makroskopické posouzení a příprava vzorku před vlastní analýzou

Před otevřením láhve se makroskopicky posuzují vypadlé částice, obvykle obrácením láhve s vínem dnem vzhůru a pozorováním proti světlu. Podle charakteru vypadlých částic se posuzuje povaha zákalu (zda jde o sraženinu jemnou, hrubou, vločkovitou, krystalickou apod.). Je-li k dispozici pouze jeden vzorek zakaleného vína, nechávají se před dalším zkoušením rozvířené vypadlé částice znovu sedimentovat (pokud sedimentují). Není-li k tomu dosti času, pouští se od makroskopické zkoušky.

Způsob odběru a příprava vzorků k analýze se řídí povahou zákalu vína. Je-li zákal ve víně stejnoměrně rozptýlen, může se víno přímo odlít po otevření láhve do kyvety, v níž se víno odstřeďuje. Je-li zákal usazen na dně nebo na stěnách láhve, musí se láhev opatrně otevřít a buď se čistou hadičkou stočí hlavní podíl vína do jiné nádoby a ve zbytku vína v láhvi roztřepe usazená sraženina (lpí-li pevněji na láhvi), nebo se čistou pipetou nasaje volně plovoucí u dna zkoncentrovaná sraženina a přenese do nádoby k odstředění.

Odstřeďuje se v laboratorní elektrické odstředivce při 2 až 3000 ot/min. Rychlost odstředění se řídí podle toho, je-li zákal hrubší, dobře sedimentující



Obr. 1. Schéma analytického postupu při identifikaci zákalů přírodních lahvových vín

nebo jemnější. Podle toho se také řídí doba odstřeďování, obvykle asi 10 minut. Sraženina se po odstředění promyje 10% alkoholem a znovu odstředí, aby se zbavila zbytků vína.

Pro posouzení spalitelnosti sraženiny se připravuje ze sraženiny spodogram tak, že se sraženina (zbavená zbytků vína, několikerým pečlivým promytím 10% alkoholem) přenesne na podložní mikroskopické sklíčko a zahřívá zpočátku velmi opatrně, později silněji na azbestové síťce nesvítivým plamenem. Přitom se pozoruje, zda sraženina zuhelní, spaluje-li se částečně nebo úplně a posuzuje se množství vzniklého popela. Tomuto způsobu se dává přednost před spalováním na kovové špachtli, kde proces spalování probíhá příliš rychle a špatně se pozoruje. V popelu na sklíčku lze kromě toho po žihání dokázat přítomnost některých látek kapkovými reakcemi.

1. Zákaly biologické

Přítomnost kvasinek se zjišťuje mikroskopickým vyšetřením. Vzorek vína se odebere sterilní pipetou a odstřeďuje v laboratorní odstředivce při 2000 až 3000 ot/min tak dlouho, až víno nad sedimentem je čiré nebo až se netvoří další sediment. Po dekantování čirého vína se připraví ze sedimentu, rozmíchaného ve zbytku vína, nativní mikroskopický preparát, který se pozoruje mikroskopem při 600 až 800násobném zvětšení.

Přítomnost bakterií se zjišťuje obdobně jako přítomnost kvasinek, pouze s tím rozdílem, že se mikroskopický preparát suší, fixuje a barví podle Gramma. Takto připravený preparát se pozoruje mikroskopem za použití imerse při 1000násobném zvětšení.

Přítomnost vláken a části micel plísní se zjišťuje stejně, jako přítomnost kvasinek.

2. Zákaly bílkovinné

Bílkoviny se vyskytují v zákalech lahvových vín v různých formách, které nelze analyticky jednotně stanovit. Některé z nich dávají pravé reakce bílkovin, jiné — stejně jako jejich štěpné produkty (albumózy, peptóny, aminokyseliny), tyto reakce nedávají a dokazují se u nich pouze dusíkaté látky.

V klasické analytice existují četné metody k důkazu bílkovin, které však jsou pro stanovení ve víně většinou málo specifické. Ve výzkumném pracovišti autora byla vyzkoušena k důkazu bílkovin metoda,

popsaná Kochem [6] a k důkazu dusíkatých látek metoda, kterou popisují Tanner a Vetsch [2].

K důkazu bílkovin se používá proužku chromatografického papíru (W 1—3), na který se po odcentrifugování nanese sedlina a nechá zaschnout. Papírek se sedlinou se ponoří pak na 10 minut do nasyceného roztoku Amidové černě 10 B, nebo do Asokarmínu, rozpuštěného ve směsi metanol—ledová kyselina octová v poměru 9 : 1.

Pak se zbaví proužek papíru přebytkem barviva postupným koupáním v několika Petriho miskách s čistým rozpustidlem metanol—kyselina octová. Přítomnost bílkovin se projeví vybarvením toho místa na proužku chromatografického papíru, kde byla nanesená sedlina ze zkoušeného vína. Při negativní reakci se odbarví celý proužek i v místě nanesení sedliny. Zkouška je poměrně rychlá a dává reprodukovatelné výsledky. Vybarvený proužek chromatografického papíru může být uschován jako důkaz pro dokumentaci.

K důkazu dusíkatých látek se žihá sedlina, připravená ze zákalu odstředěním ve zkušební skleněné baničce (pro provádění analytických zkoušek na suché cestě) s kovovým sodíkem až k úplnému zuhelnatění v plameni plynového kahanu. Rozžhavená banička se potom nechá prasknout ve skleněné mističce se 3 ml destilované vody. Po krátkém vyloužení obsahu baničky ve vodě se nalije takto vzniklý roztok do zkumavky, přidá se několik malých krystalků FeSO_4 a krátce povaří. Po ochlazení se přidá 1 ml 10% HCl. V přítomnosti dusíkatých látek vznikne modré zabarvení.

3. Zákaly z korků

Při identifikaci korkových zákalů se určují z korků uvolněné třísloviny, event. lignin. K identifikaci tříslovin se používá reakce tříslovin s basickými barvivy [7], které se tříslovinami fixují. Lignin se dokazuje barvením podle Herzberga nebo floroglucinem.

Třísloviny se dokazují tak, že se sraženina z vína, promytá 10% alkoholem nanese na proužek chromatografického papíru a nechá zaschnout. Potom se namáčí proužek papíru 10 minut v nasyceném vodním roztoku malachitové zeleně nebo metylové violeti a po vyjmutí z roztoku barviva se postupně odbarvuje v několika Petriho miskách s 3 až 5% kyselinou octovou. Obsahuje-li nanesená sraženina

třísloviny, zůstává na místě, kde byla sraženina nanášena vybarvená skvrna, zatímco okolní papír se odbarví.

Lignin se dokazuje barvením podle *Herzberga*, jímž lze také dokazovat přítomnost celulózy. Zkouší se nejlépe na podložním mikroskopickém sklíčku, na něž se nanese část sraženiny, přikryje se krycím sklíčkem a ze strany přikápně mezi obě sklíčka *Herzbergův* roztok. Za přítomnosti ligninu se barví sraženina žlutě, v přítomnosti celulózy modře.

Příprava *Herzbergova* roztoku

Roztok A: 20 g suchého ZnCl_2 se rozpustí v 10 ml vody.

Roztok B: 2,1 g KI a 0,1 g I_2 se rozpustí v 5 ml destilované vody.

Roztok A a B se smíchá, nechá ustát a čirý roztok se dekantuje do reagenční lahvičky. Do čirého roztoku se vhodí 1 krystalek jódu.

Jiný způsob identifikace ligninu spočívá v barevné reakci, při níž sraženina charakteristicky vínově zčervená, obsahuje-li lignin s roztokem floroglucinu v konc. HCl.

4. Zákal z vysrážených barviv

Vzhledem k množství komponent, tvořících barevné látky ve víně, se obvykle tyto neidentifikují specifickými reakcemi, což by vyžadovalo chromatografické dělení, nýbrž se pouze vizuálně posuzují po rozpuštění barevné sraženiny v koncentrovaných kyselinách.

Sraženina, obsahující barviva, je již po zkoncentrování odstředěním nápadně zbarvena. Při bližší identifikaci se přenese část sedimentu po odstředění do zkumavky, přidá 2 až 3 ml 10% alkoholu, několik kapek 10% HCl a mírně se zahřívá. Barvivo se rozpustí a zbarvení zřetelně vystoupí.

Červené zbarvení u sraženin z červených vín, způsobené anthokyany, přechází po zalkalizování několika kapkami 10% roztoku NaOH do modrofialového.

Sraženiny, obsahující pouze vysrážená barviva a třísloviny, shoří při žíhání prakticky beze zbytku.

5. Zákal kovové

Kovové zákal se identifikují chemickými zkouškami, při nichž se určuje jak kation, tak anion příslušné sloučeniny, vysrážené ve víně. Jsou to většinou zkoušky klasické analytiky, některé z nich uvádí ve své práci *Tanner a Wetsch* [2].

Důkaz FePO_4

Trojmocné železo se dokazuje rozpuštěním části sraženiny v malé porcelánové odpařovací misce nebo na zkušební destičce pro kapkové reakce v 10% roztoku HCl a přidáním 2 až 3 kapek 10% roztoku KCNS nebo HN_4CSN . Za přítomnosti Fe^{3+} vznikne intenzivní krvavě červené zbarvení.

Aniont PO_4^{3-} se určí po zalkalizování sraženiny 1 kapkou 10% roztoku NaOH a okyselení kapkou 10% HNO_3 molybdenanem amonným. Po přidání několika kapek 10% roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, vznikne žlutá sraženina fosfomolybdenanu amonného.

Informativní zkouškou na přítomnost FePO_4 ve víně je jeho rozpustnost na denním světle, rozpustnost v HCl a zesílení zákalu provzdušněním nebo přidávkou H_2O_2 .

Důkaz tanátu železitého

Železo se určí rhodanidem draselným, stejně jako u FePO_4 . Třísloviny dávají v neutrálních nebo slabě kyselých roztocích s FeCl_3 špinavě zelené až modré zbarvení. Sraženina se rozpustí v několika kapkách 10% NaOH, opatrně zneutralizuje 10% roztokem HCl a přidá se 0,5 ml 5% roztoku FeCl_3 . V přítomnosti tříslovin vznikne špinavě zelené až modré zbarvení.

Důkaz mědi

Přítomnost kationtu Cu_2^{2+} se dokazuje rozpuštěním vzorku sraženiny v malém množství 10% HCl a zalkalizováním přebytkem 10% NH_4OH . Za přítomnosti kationtu Cu_2^{2+} vznikne intenzivní modré zbarvení.

Informativní zkouškou na rozeznání zákalu způsobeného Cu_2SO_3 je jeho rozpuštění po provzdušnění vína, po přidání HCl nebo H_2O_2 .

Důkaz síry

Organicky nebo anorganicky vázaná síra se elementárně dokazuje heparovou reakcí. Sraženina se vpraví do malé skleněné baničky (pro zkoušky na suchou cestu), opatrně vysuší nad kahanem, přidá se malý kousek kovového sodíku (krychlíčka asi 1 mm³ velká) a zahřívá v plameni plynového kahanu tak dlouho, až úplně zuhelní. Potom se vpusť horká banička do zkumavky se 3 ml destilované vody. Banička praskne a její obsah se vyloučí ve vodě. Vlastní důkaz síry se provádí tak, že kapkou tekutiny ze zkumavky se ovlhčí vyleštěný stříbrný plech. Za přítomnosti síry vznikne v místě ovlhčení za několik vteřin černá skvrna, která na plechu pevně lpí.

6. Zákal krystalické

Krystalické zákal se identifikují mikroskopickými a chemickými zkouškami. Mikroskopický obraz krystalků vinnů bývá dosti variabilní a závisí na podmínkách, za jakých byl připraven preparát k mikroskopování.

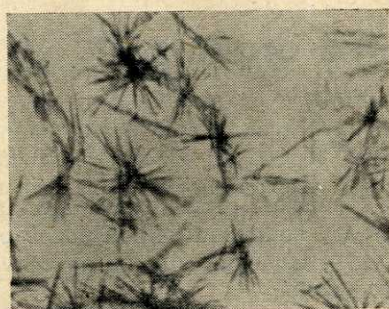
Z vína vyloučený vinný kámen je zřídka tak čistý, aby jej bylo možno přímo mikroskopovat, nehledě k tomu, že se vylučuje často v makrokrystalech a drúzách, vznikajících slepením menších krystalků, jež se k mikroskopování nehodí. Bývá obalen z vína vysráženým barvivem a pro mikroskopické pozorování se musí překrystalizovat. Podle toho, byla-li krystalizace provedena z horké vody nebo z 10% alkoholu, vznikají dosti nejednotné, navzájem se lišící krystaly, které méně zkušený pracovník může zaměňovat, např. s krystaly vinnanu vápenatého (obr. 2 a 3).

Z toho důvodu se provádí při identifikaci zkouška doporučená *Tannerem* [3], jež spočívá v převedení event. přítomného vinnanu vápenatého kyselinou sírovou na síran vápenatý, který se vylučuje v jemných jehlicovitých krystalcích a mikroskopicky se výrazně liší od krystalků obou vinnů (obr. 4).

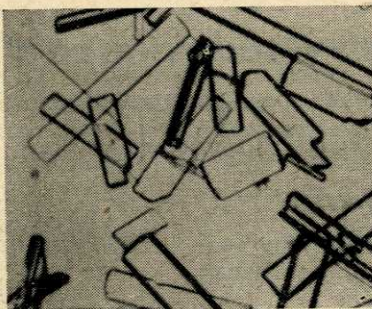
Chemickou zkoušku na aniont krystalických zákalů — kyselinu vinnou, lze povádět chromatograficky podle *Tannera* po předchozím uvolnění kyseliny vinné měničem iontů.

Důkaz drasíku, vápníku a rozlišení vinného kamene od vinnanu vápenatého

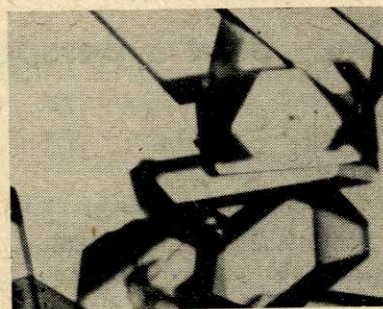
Draslík se dokazuje plamennou zkouškou: Část



Obr. 2. Krystaly vinného kamene



Obr. 3. Krystaly vínanu vápenatého



Obr. 4. Krystaly síranu vápenatého

sedimentu se nabere do očka vyžíhaného platino-vého drátku, ovlhčí 1 kapkou 10% HCl a ihned vnoří do nesvítivého plamene plynového kahanu. Za přítomnosti draslíku se plamen zbarví fialově. K snadnějšímu pozorování (odfiltrování žlutého zbarvení způsobeného stopami sodíku) se používá kobaltového skla.

Vápník barví při plamenné zkoušce plamen cihlově červeně. Při dalším žihání platinového očka se sedimentem obsahující vápník vzniká CaO, jenž v nesvítivém plameni plynového hořáku charakteristicky svítí (Drummondovo světlo).

Vínan vápenatý se od kyselého vínanu draselného rozliší zkouškou doporučenou Tannerem: Část zkoušené krystalické sraženiny se přenesle na hodinové sklíčko průměru 3 až 5 cm, přidá se 1 ml 10% H_2SO_4 a sklíčko se zahřívá na azbestové síťce velmi slabým plamenem tak dlouho, až se sraženina rozpustí. Potom se přestane zahřívát. Po vychladnutí sklíčka se vyloučí za přítomnosti vínanu vápenatého jehlicovité krystalky $CaSO_4$, které se pozorují při malém zvětšení pod mikroskopem. Je-li přítomen vinný kámen, původní krystalická sraženina se rozpustí a zčerná, ale jehlicovité krystalky se nevytvoří.

K důkazu kyseliny vinné se používá také reakce s kyselinou galovou. Zkouška se provádí ve zkumavce nebo na podložním sklíčku, kde se zahřívá vzorek sraženiny s kapkou 0,01% roztoku kyseliny galové v konc. kyselině sírové. Za přítomnosti kyseliny vinné se objeví modrozelené zbarvení.

7. Zákal z mycích prostředků

Identifikace těchto zákalů bývá obtížná, jelikož vyloučený vápník a hořčík nelze určovat přímo a jejich separace je vzhledem k nepatrnému množství sraženiny velmi nesnadná. Určitým vodítkem je přítomnost aniontu PO_4^{3-} , který je ovšem i součástí jiných zákalů. V případě důkazu tohoto aniontu a negativní reakce na Fe^{3+} se provádí další šetření přímo na provozu (zjišťuje se, zda se používá mycích prostředků a v jakých dávkách).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИЧИН ПОМУТНЕНИЯ ВИНА В БУТЫЛКАХ

В статье описывается аналитический метод определения причин помутнения натурального вина в бутылках. Метод обеспечивает идентификацию характера и причин помутнения с минимальной затратой времени. Предлагаемые аналитические приемы были разработаны на основании опыта и экспериментального изучения в лаборатории нац. предприятия Винаржске заводы в Праге.

IDENTIFIKATION DER TRÜBUNGEN BEI NATUR-FLASCHENWEINEN

Es wurde ein systematisches analytisches Verfahren zur Identifikation der Trübungen in Natur-Flaschenweinen ausgearbeitet. Das beschriebene Verfahren ermöglicht eine schnelle Orientierung über den Typ der analysierten Trübung. Das Verfahren besteht aus analytischen Methoden und wurde aufgrund der Versuche und praktischen Erfahrungen der Forschungsstation der Prager Weinbetriebe ausgearbeitet.

IDENTIFYING THE CHARACTER OF TURBIDITY OF BOTTLED WINE

The article deals with an analytic process which has been developed for identifying the character of turbidity in bottled natural wine. The method requires little time and enables reliable classification of turbidities. It has been suggested, developed and verified in the research laboratory of the Prague Winery.

8. Zákal, způsobené částicemi filtračních materiálů a mechanické nečistoty

Vláčna azbestu se při žihání nespálují a svítí. Důkaz celulózy je popsán při identifikaci zákalů z korků. Sediment, obsahující částičky parafinu (z korků) se rozpouští v xylolu, při zahřívání na podložním sklíčku taje, charakteristicky páchne a nakonec se odpaří beze zbytku.

Závěr

Článek popisuje analytické metody, kterými lze určit látky, jež jsou příčinou zákalů přírodních lahvových vín. Ve vinařské praxi se stává, že pracovníci se snaží odstraňovat zákal ve víně zkusmo, bez předběžné identifikace, a to různými, často neúčelnými manipulacemi, např. opakovanou filtrací. Tento způsob nevede většinou k žádným výsledkům, vína se nevyčerí nebo se později znovu kalí, protože byla nevhodně porušena jejich fyzikálně chemická rovnováha.

Proto je zapotřebí, aby každé zakalené víno bylo předem podrobeno rozboru a teprve po určení podstaty zákalu byl proveden potřebný technologický zákrok k jeho odstranění. Jedině tak lze předejít opakovanému výskytu zákalů v lahvových vínech a účinně bojovat proti zmetkovitosti ve výrobě.

Literatura

- [1] Beneš V.: Problematika zákalů přírodních lahvových vín Kvasný průmysl 9, 225 (1962).
- [2] Tanner H., Vetsch U.: Wie werden Getränke trübungen charakterisiert? Schweiz. Zeitschrift für Obst und Weinbau 11, 238 (1956) a 12, 261 (1956).
- [3] Tanner H.: Über die eiwandfreie Erkennung von Weinstein und Calciumtartratrübungen. Obst und Weinbau 68, 509 (1952).
- [4] Nečajev L. N.: Předupřezděníje pomutněníja vin. Piščepromizdat, Moskva 1950.
- [5] Neoral K., Blaha J.: Nemoci a vady révových vin. Brázda, Praha 1949.
- [6] Koch J.: Zur Stabilität der Konsumweine. Weinberg und Keller 5, 432 (1958).
- [7] Burkhardt R.: Kork und Korkbehandlung in den Kellereien. Weinberg und Keller 11, 427 (1960).
- [8] Šalda J.: Tiskafské papíry. SNTL Praha 1959.
- [9] Feigel F.: Tülpelreaktionen zur Prüfung von Filterpapieren. Z. anal. Chem. 152, 52 (1956).
- [10] Keil M.: Zákalý vin. Kvasný průmysl 1, 225 (1955).

Došlo do redakce 3. 12. 1962.