

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chemie**



**Vliv délky vinifikace a různých kmenů kvasinek na  
následný průběh malolaktické fermentace**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Lubomíra Hornáková**

**Vedoucí práce: Ing. Matyáš Orsák**

© 2016 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Vliv délky vinifikace a různých kmenů kvasinek na následný průběh malolaktické fermentace" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2016

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mojí práce panu PhDr. Ing. Matyášovi Orsákovi, konzultantovi práce panu Ing. Petrovi Ptáčkovi za odbornou pomoc a kolektivu Zámeckého vinařství Bzenec s.r.o. za spolupráci při výzkumné práci.

# Vliv délky vinifikace a různých kmenů kvasinek na následný průběh malolaktické fermentace

## Souhrn

Předmětem bakalářské práce bylo stanovení jednotlivých organických kyselin, konkrétně vinné, jablečné a mléčné kyseliny v hroznovém moštu po dokvašení prostřednictvím vysoce účinné kapalinové chromatografie. Důvodem zkoumání množství organických kyselin jsou odlišné mikrobiologické podmínky kvašení moštů s následným dopadem na senzoryckou jakost vzniklých vín. V teoretické části je uvedeno technologické zpracování hroznů při výrobě vína, charakterizované je anatomické a chemické složení vinné révy, mikrobiota hroznů a její význam v procesu změn obsahů organických kyselin. Zvlášť kapitoly jsou věnované konkrétním druhům kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* a bakterií *Oenococcus oeni* jako zásadním účastníkům fermentace. Vliv této mikrobioty je vyhodnocován v části praktické, kdy se jednotlivé inokulace evidují a dokvašené mošty analyzují separační metodou vysoce účinné kapalinové chromatografie. Obsah organických kyselin a délka kvašení vypovídá o vlivech zúčastněné mikrobioty na délku vinifikace a fyzikálně-chemické parametry kvašení. Pro celkové posouzení účinnosti použité mikrobioty na jednotlivé kvasící mošty je v závěru provedeno senzorycké hodnocení vzorků.

**Klíčová slova:** jablečná kyselina, mléčná kyselina, technologie, víno, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*

# **Influence of different lengths and vinification yeast strains on the subsequent conduct of malolactic fermentation**

## **Summary**

The topic of this bachelor thesis is to determine individual organic acids, specifically tartaric, malic and lactic acids in grape must after a final fermentation using high performance liquid chromatography. The reason behind examining the levels of organic acids are various microbiological conditions of fermenting musts with the subsequent influence on the sensoric quality of the resulting wines. In the theoretical section we describe the technological processing of grapes during wine making, characterize the anatomical and chemical structure of the used grapevine, grape microbiota and its influence on the process of organic acid transformations. Separate chapters are dedicated to specific species of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* and bacteria *Oenococcus oeni* for their fundamental place in the fermentation process. The influence of this microbiota is evaluated in the practical section, where the records of individual inoculations are noted and the fermented musts are analyzed using the separational method of high performance liquid chromatography. The levels of organic acids and the length of fermentation gives evidence of the influence of the participating microbiota on the length of wineification and the physico-chemical parameters of fermentation. For the general assesment of efficiency of the used microbiota on individual fermentatated musts, a sensoric evaluation of samples is conducted.

**Keywords:** malic acid, lactic acid, technology, wine, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii*

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Cíl práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3 Přehled literatury</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1 Historie vinařství</b> .....	<b>3</b>
<b>3.2 Vinná réva</b> .....	<b>3</b>
3.2.1 Ekologické požadavky vinné révy .....	3
3.2.2 Anatomické složení hroznů .....	4
3.2.3 Chemické složení hroznů.....	4
3.2.4 Mošt a jeho chemické komponenty .....	5
3.2.4.1 Sacharidy .....	5
3.2.4.2 Minerální látky .....	6
3.2.4.3 Buketní látky .....	6
3.2.4.4 Dusíkaté látky .....	6
3.2.4.5 Organické kyseliny .....	7
3.2.4.6 Polyfenoly.....	8
<b>3.3 Vinifikace – výroba vína</b> .....	<b>9</b>
3.3.1 Příjem hroznů.....	9
3.3.2 Zpracování hroznů .....	9
3.3.2.1 Drcení .....	9
3.3.2.2 Sírání.....	10
3.3.2.3 Naležení rmutu a scezování moštu .....	10
3.3.2.4 Lisování .....	10
3.3.3 Úprava moštu.....	11
3.3.3.1 Odkalení .....	11
3.3.3.2 Úprava cukernatosti moštu .....	12
3.3.3.3 Dokyselování moštu .....	13
3.3.3.4 Ošetření bentonitem.....	13
3.3.4 Ošetřování a stabilizace vína .....	14
3.3.4.1 Stáčení .....	14
3.3.4.2 Sírání.....	14
3.3.4.3 Čiření vína .....	14
3.3.4.4 Filtrace mladého vína .....	15
3.3.4.5 Vyzrívání vína.....	15

3.3.4.6	Stabilizace vína.....	15
3.3.4.7	Lahvování vína .....	16
<b>3.4</b>	<b>Alkoholové kvašení.....</b>	<b>16</b>
3.4.1	Historie.....	16
3.4.2	Proces kvašení moštu.....	17
3.4.3	Mikrobiota .....	18
3.4.3.1	Kvasinky.....	18
3.4.3.2	Bakterie.....	22
3.4.3.3	Plísně .....	23
3.4.4	Faktory ovlivňující alkoholové kvašení.....	24
3.4.4.1	Teplota .....	24
3.4.4.2	Cukernatost moštu .....	25
3.4.4.3	Obsah alkoholu .....	25
3.4.4.4	pH .....	25
3.4.4.5	Siřičitá kyselina .....	25
3.4.4.6	Obsah kalů .....	25
3.4.4.7	Ostatní nežádoucí látky .....	26
<b>3.5</b>	<b>Malolaktická fermentace .....</b>	<b>26</b>
3.5.1	Historie.....	26
3.5.2	Proces malolaktické fermentace .....	27
3.5.3	Regulace malolaktické fermentace .....	28
3.5.3.1	Spontánní malolaktická fermentace .....	28
3.5.3.2	Řízená malolaktická fermentace.....	29
3.5.4	Faktory ovlivňující malolaktickou fermentaci.....	30
3.5.4.1	Vliv kvasinek na růst mléčných bakterií a malolaktickou fermentaci.....	30
3.5.5	Ukončení malolaktické fermentace .....	31
3.5.6	Vliv malolaktické fermentace na složení vína.....	31
<b>3.6</b>	<b>Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....</b>	<b>32</b>
3.6.1	Princip chromatografie .....	32
3.6.2	Rozdělení chromatografických metod .....	32
3.6.3	Kapalinová chromatografie.....	33
<b>4</b>	<b>Materiál a metodika .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Odrůdy vín - vzorky .....</b>	<b>34</b>
4.1.1	Bílé měřené odrůdy.....	34
4.1.1.1	Chardonnay.....	34
4.1.1.2	Müller Thurgau.....	34

4.1.1.3	Sauvignon .....	34
4.1.1.4	Rulandské bílé .....	34
4.1.1.5	Veltlínské zelené .....	34
4.1.2	Modré měřené odrůdy .....	34
4.1.2.1	Frankovka modrá .....	34
4.1.2.2	Modrý Portugal .....	35
4.1.2.3	Rulandské modré .....	35
4.1.2.4	Svatovavřínecké .....	35
4.1.2.5	Zweigeltrebe .....	35
<b>4.2</b>	<b>Přístroje a chemikálie .....</b>	<b>35</b>
4.2.1	Přístroje měření .....	35
4.2.2	Použité chemikálie .....	36
<b>4.3</b>	<b>Hodnocení vína .....</b>	<b>36</b>
4.3.1	Senzorické hodnocení .....	36
4.3.1.1	Posouzení zrakem .....	36
4.3.1.2	Posouzení čichem .....	37
4.3.1.3	Posouzení chutí .....	37
4.3.2	Fyzikálně-chemické metody .....	37
4.3.3	Kontrola stability vína vůči zákalům .....	38
4.3.4	Mikrobiologická kontrola .....	38
<b>4.4</b>	<b>Stanovení organických kyselin metodou HPLC .....</b>	<b>39</b>
4.4.1	Měření standardů .....	39
4.4.2	Stanovení organických kyselin .....	39
<b>5</b>	<b>Výsledky a diskuze .....</b>	<b>40</b>
5.1	Kalibrační měření a nejistoty HPLC .....	40
5.2	Měření organických kyselin .....	40
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>42</b>
	<b>Seznam použitých symbolů a zkratk .....</b>	<b>43</b>
	<b>Zdroje .....</b>	<b>44</b>
	<b>Přílohy .....</b>	<b>47</b>



# 1 Úvod

Víno se řadí k nejčastěji podávaným a oblíbeným alkoholickým nápojům, vyráběným z vinné révy kvašením moštu. Vinařství má v historii dlouholetou tradici a kdysi se víno označovalo za nápoj bohů. V dnešní době existuje mnoho variací vín. Nejtradičnější rozdělení je dle barvy na bílá, růžová a červená, dále pak podle výrobních technologií na tichá, šumivá a likérová vína. S rostoucí oblibou rostou také požadavky na jakost vín a tím i tlak na výrobce vín. Pro kvalitní produkci dobrého vína se vědci a enologové pomocí výzkumů snaží vylepšit proces výroby vína a tím tak ovlivnit výslednou sensorickou jakost a požitek z vína.

Na základě fyzikálně-chemických metod se nejčastěji upravují podmínky technologie výroby a sledují se změny v průběhu celého výrobního procesu před, během i po kvašení z hlediska fyzikálně-chemického, protože pouze sensorické hodnocení může být zavádějící. Z tohoto důvodu se stanovují chemické složky vín, jako je množství alkoholu, organických kyselin, cukru, aromatických sloučenin nebo fyzikálně významné pH a teplota. Jednotlivé součásti spolu hrají významnou roli v mikrobiální stabilitě vína, a tedy i v skladování vína, kdy kyseliny mohou sloužit jako konzervační činidla. K hlavním kyselinám vín patří vinná, jablečná a mléčná kyselina. Během výroby lze ovlivňovat jejich obsah úpravami moštu a značný význam má také jablečno-mléčná fermentace.

Pro kontrolu množství jednotlivých kyselin je využívána metoda vysoce účinné kapalinové chromatografie. Tato separační metoda svojí přesností poskytuje velmi konkrétní a hodnotné údaje o množství jednotlivých organických kyselin a umožňuje tak vinařům adekvátně zasahovat do výrobního procesu s cílem vytvořit perfektní víno.

## 2 Cíl práce

- 1) z literárních zdrojů sestavit literární přehled, týkající se použití vinifikace, využití kulturních kmenů kvasinek a různé technologie výroby vína na kvalitu výsledného produktu
- 2) shromáždit dostatek podkladů pro zhodnocení malolaktického kvašení, jeho významu a vlivu na výsledný produkt (víno)
- 3) uskutečnit první sérii pokusů, kde bude zohledněn vliv délky vinifikace a použití vybraných kmenů kvasinek na průběh malolaktického kvašení a jeho dopady na sensorickou kvalitu produktu

Hypotéza:

- 1) delší vinifikace a přidavek čisté kultury kvasinek ovlivní pozitivně sensorické vlastnosti vína
- 2) delší vinifikace a přidavek čisté kultury kvasinek ovlivní pozitivně obsah mléčné kyseliny a sníží obsah jablečné kyseliny ve víně

## **3 Přehled literatury**

### **3.1 Historie vinařství**

Římané přinesli vinnou révu na české území během přesouvání legií z Vídně pod vápencovou Pálavou za Mikulovem. Samotné pěstování obyvatelé poznali od kmenů v Podunají. Podle pověsti založila první vinice sv. Ludmila. V darovací listině od Svytoplacha II. se nachází první zmínka o českých vinicích v Litoměřicích roku 1057, na Moravě je to v roce 1101 z darovací listiny kláštera benediktinů v Třebíči. Karel IV. vydal nařízení o zakládání vinic v roce 1358, čímž zvýšil zájem o vinařství. Největší moravské vinařské oblasti (1368) byly Hustopeče, Znojmo, Mikulov. Povinné zápisy všech vinic do viničných knih a kontrolu jakosti zavedl Vladislav Jagellonský (1497). K roku 1654 bylo zaznamenáno dohromady 21 664 hektarů vinic v Čechách a na Moravě. Vlivem révokazu a houbových chorob klesala plocha vinic do roku 1930 až na 3870 hektarů na Moravě. Od té doby se začala plocha zvyšovat až do současného stavu, kdy je to přes 19 000 hektarů s roční produkcí 6 tun hroznů z jednoho hektaru.

Legislativa pro pěstování révy vinné, výrobu a prodej vína řídí zákon č. 256/2011 Sb., kterým se mění zákon č. 321/2004 Sb. O vinohradnictví a vinařství. Další úpravy budou vyžadovány pro soulad s nařízeními platnými v EU. [17]

### **3.2 Vinná réva**

Vinná réva (*Vitis vinifera*), patří do čeledi révovité *Vitaceae*. Je to liánovitá, světlomilná rostlina s mohutným kořenovým systémem. [34]

#### **3.2.1 Ekologické požadavky vinné révy**

Kvůli klimatickým podmínkám je vinohradnictví vymezeno pouze do dvou úzkých zeměpisných pásů. První je na severní polokouli a zahrnuje oblasti evropské a severoamerické. Druhý, na jižní polokouli, obsáhne státy Chile, Argentiny, JAR, Austrálie a Nového Zélandu. Z celkové produkce vína pochází až 98 % z těchto dvou pásů. Mezi největší producenty se řadí Itálie, Francie, Španělsko, Argentina, USA, Německo. [34]

### **3.2.2 Anatomické složení hroznů**

Hrozen révy se skládá z třapiny a bobule. Parametry pro zpracování hroznů jsou hmotnostní poměry těchto částí hroznů, jejich technologická vyzrálost a chemické složení.

Třapina je zelená až do optimální zralosti, kdy dřevnatí a hnědne. Vyluhování třísloviny a chlorofylu do moštu z třapin poškozuje sensorické vlastnosti vína. Bobule se skládá ze slupky, dužiny a semen. Složení hroznů je závislé na odrůdě a má vliv na barvu, vůni, chuť a celkový charakter vína. [34] Dužina je složená ze dvou částí, a to vnější – obvodové, která je šťavnatější, a vnitřní – tužší, kde lze nalézt semena cévní svazky. Obsahuje podstatnou část šťávy bobule. [24] Semena jsou také součástí hroznů o obsahu 1 – 4 v bobuli. Bobule mohou i nemusí obsahovat semena, záleží od odrůdy. 85 – 90 % z hmotnosti bobule tvoří dužina, která je z hlediska zpracování i přímé konzumace nejvýznamnější. Větší část tvoří mošt a zbytek (5 – 8 %) dužina. [34]

### **3.2.3 Chemické složení hroznů**

Třapiny obsahují malé množství cukrů, vinné a jablečné kyseliny, ale více tříslovin, dusíkatých a minerálních látek. Nedořálé obsahují značné množství zelených a žlutých barviv. Ty jsou nežádoucí při lisování, kdy může nastat vytlačení chlorofylových pigmentů do moštu, čímž se znehodnocuje jeho kvalita. To je důvod proč se před lisováním třapiny odstraňují. [24] Slupky bílých hroznů obsahují flavonová barviva a chlorofyl. V červených a modrých odrůdách jsou antokyany v různém poměru podle odrůdy. Typické pro bobule je vosková vrstva na povrchu chránící před odparováním vody a mikroorganismy. [34] Buněčné šťávy slupky obsahují cukry, organické kyseliny, třísloviny, oxalát vápenatý, dusíkaté a minerální látky a již zmíněné barviva a chlorofyl. Obsah cukrů a kyselin je ve slupkách zralých bobulí nižší než v nezralých, neboť je během vývinu slupka fotosynteticky aktivní. [24]

Dužina sestává z vody, cukrů, volných organických kyselin, vázaných organických kyselin, minerálních látek a dusíkatých látek. Třísloviny, zelená, žlutá a červená barviva, vitamíny, enzymy, buketní látky a popeloviny se v dužině nacházejí v menším množství.

Podstatnou část sušiny zastupuje olej, který je zelený a jeho hlavními komponenty jsou glyceridy stearové, dále palmitové a linolové kyseliny. Další významnou složkou jsou třísloviny. Semena bílých bobulí mají méně tříslovin jako semena modrých. Hlavní součástí tříslovin jsou katechiny (katechingalát a galokatechin), které tvoří 20 %. Třísloviny se extrahují do mladých vín v nakvašovací procesu při výrobě červeného vína. Semena obsahují také leukoantokyany, které zvyšují kvalitu červených vín. Ze sacharidů lze

v semenech nalézt glukózu, fruktózu a sacharózu. Jejich množství je rozdílné a závisí od jednotlivých kultivarů. [24]

### **3.2.4 Mošt a jeho chemické komponenty**

Hroznový mošt je vodní roztok cukrů a jiných látek, s hustotou mezi  $1,06 - 1,20 \text{ g/cm}^3$ . [20]  
Jakost vylisovaného moštu závisí od stupně zralosti hroznů, ekologické podmínky roku, zdravotní stav a pěstovatelské podmínky. Chemické složení do určité míry působí na způsob lisování. Rozdílná kvalita moštů z jednotlivých kultivarů je základem pestrosti vinařských výrobků.

Nezralé hrozny mají nízký obsah cukrů, buketních látek, antokyanových barviv (v případě modrých hroznů), bílkovin, aminokyselin atd. a zvýšený obsah kyselin, hlavně kyseliny jablečné a šťavelové. Mošty z vyzrálých bobulí jsou bohatší na látky tvořící buket a chuť vína.

Dalším faktorem chemického složení je typ půdy a poloha pozemku. Nejvyšší hrozny se dopěstují v nadmořské výšce  $10 - 300 \text{ m n. m.}$  na svazích a kopcích s jižní expozicí. Vinné révy se daří ve skalnatých, kamenitých, písečných, jílovitých a písečnohlinitých půdách. Teplotní energie má vliv během vyzrání bobulí na fyziologické přeměny látek a syntézu látek nových. Tvoří se větší množství cukrů, transformují se zejména na jablečnou a vinnou kyselinu.

Na chemické složení moštů působí jednotlivé agrotechnické faktory: řez a vedení, výsadby, výživa a ochrana vinné révy vůči nemocem. Na kvalitu moštu značně působí systém zpracování hroznů. Vylisované mošty obsahují více tříslovin, olejů, chlorofylových pigmentů, bílkovin v porovnání s moštem, která samovolně odtéká a obsahuje více cukrů a kyselin. [17]

#### **3.2.4.1 Sacharidy**

Nejvýznamnější cukry jsou obsaženy v bobulích. [28] Glukóza je aldehydický cukr s redukčními vlastnostmi. Kvasinky zkvašují glukózu na etylalkohol. Fruktóza s ketoskupinou má redukční reakce pomalejší než glukóza. Fruktofilní kmeny kvasinek zkvašují fruktózu přednostně před glukózou na etanol. [24] V době zralosti a sběru bobulí je poměr cukrů přibližně 1:1. Hlavním parametrem pro zařazení vín do jakostních stupňů dle obsahu cukru je cukernatost. Od cukernatosti se dále odvíjí obsah alkoholu ve víně. [28]

### 3.2.4.2 Minerální látky

Minerální látky se při zpracování hroznů lisováním vytlačují z bobulí do moštu. Lehce se stanovují, protože spálením moštu zůstávají v popelu. [24] V popelu vína převládá obsah dusíku (50 %) a fosforečná kyselina. [18] Množství popelu v moštích se pohybuje v rozmezí 1,4 – 10,2 g/l a souvisí s hnojením půdy, obsahem vody v půdě a složením půdního profilu jednotlivých vinohradnických polí. Dalším významným minerálem nacházejícím se v popelu je draslík (ve formě K<sub>2</sub>O v množství 50 – 70 % celkového popela). [24] Draslík má funkci aktivátoru enzymatických procesů. [28] Důležité je zmínit i přítomnost kationtů Cu<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup> a aniontů PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup>, BO<sub>3</sub><sup>3-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. [24] V moštu se nachází v množství nad 0,1 g/l. K jejich velkému úbytku dochází během fermentace. [20]

### 3.2.4.3 Buketní látky

Aromatické látky jsou koncentrovány ve slupkách bobulí, ze kterých se uvolňují krátkým kvašením po odzrnění. [34] Sloučeniny podílející se na buketu jsou směsí aromatických alkoholů, aldehydů, esterů, kyselin, dusíkatých sloučenin a heterocyklických sloučenin. V reakci s kyslíkem oxidují a ztrácí svoji charakteristickou vůni. V průběhu dozrávání slupky se akumulují přímo v ní nebo v okrajových vrstvách dužiny. Každá odrůda má svůj typický buket, který je každý rok téměř stejný. Značné rozdíly jsou pouze v množství jednotlivých komponentů buketu, nejčastěji v moštích z nevyzrálých bobulí. [24] Aromatické látky podle geneze života lze rozčlenit na:

- a) primární buket – přechází z hroznů do moštu i vína
  - b) sekundární buket – vznikají v průběhu fermentace, školení a zrání vína
  - c) terciální buket – vznikají vazbou látek primárního a sekundárního aromatu při ležení vína.
- [20]

### 3.2.4.4 Dusíkaté látky

V hroznových bobulích jsou dusíkaté látky rozmístěny nerovnoměrně. Nejvíce jich lze nalézt ve vnějších vrstvách slupek, méně v dužině. [24] V moštu lze nalézt dusík v rozpětí 0,2 – 0,4 g/l. [36] Látky dusíkatého původu nacházející se v moštích jsou aminokyseliny, bílkoviny, amonné soli, aminy a dusičnany. Aminokyseliny slouží jako výživa pro kvasinky a bakterie, ale také se podílí na tvorbě sekundárního buketu. Bílkoviny v moštu a víně mají význam v jejich stabilitě. Během kvašení se množství dusíkatých látek snižuje, po fermentaci se zase zvyšuje. [20]

#### 3.2.4.4.1 Enzymy

Enzymy jsou biokatalyzátory, proto již v malých množstvích urychlují některé reakce v mošttech a víně. Procesy, které probíhají účinkem enzymů, mohou být negativní i pozitivní. K pozitivním se řadí například invertáza sacharózy na glukózu a fruktózu (umožňuje kvašení), štěpení pektinových látek (snižují viskozitu moštu a tím zlepšují sedimentaci a filtrovatelnost moštu) a účinek glykosidázy (štěpí glykosidickou vazbu, čím uvolní aromatické látky od cukru do moštu). Nepříznivý vliv má zvýšená činnost polyfenoloxidázy, která zapříčiňuje hnědnutí vína. Pro potlačení účinků enzymů je vhodné zejména zabránění přístupu vzduchu, rychlé zpracování a použití oxidu siřičitého. [12,36]

#### 3.2.4.5 Organické kyseliny

Kyseliny vznikají asimilací listů z vody a oxidu uhličitého. Celkové množství závisí od odrůdy, viničné tratě, vyzrálости hroznů a ročníku. [36]

**Vinná kyselina** spolu s chloridem draselným vzniká špatně rozpustný hydrogenvinan draselný – vinný kámen. Vinný kámen vzniká také během kvašení, přičemž alkohol jeho rozpustnost dále snižuje. [36] Obsah vinné kyseliny v moštu se pohybuje v rozmezí okolo 6 g/l, ve víně 1,5 až 5 g/l. [37] Podíl vinné kyseliny v mošttech dobře vyzrálých ročníků představuje 65 – 70 % všech titrovatelných kyselin. V případě méně vyzrálých ročníků s vyšším obsahem jablečné kyseliny činí vinná kyselina pouze 35 – 40 %. [36] Chutově jde o jemnou kyselinu s pozitivním přínosem pro celkovou harmonii chuti vína. [37]

V bobulových šťávách téměř každého ovoce, v nadzemních orgánech mnoha rostlin včetně listů, třapin a bobulí se nachází **jablečná kyselina**. V procesu dozrávání bobulí se jablečná kyselina odbourává respirací rostliny. [24] V mošttech ze severních regionů se pohybuje obsah jablečné kyseliny mezi 4 – 6,5 g/l a z jižních regionů je její obsah pouze 1 – 2 g/l. [33] Vyšší obsah jablečné kyseliny se sníží během jablečno - mléčné fermentace, která probíhá až po kvašení vína. [12]

Vinná a jablečná kyselina dohromady činí 70 – 90 % všech kyselin obsažených v hroznech. Rozličnost stupně přeměny kyselin je závislý na odrůdě a okolitém prostředí v čase zrání. Na začátku zrání jsou syntetizovány a následně jejich obsah roste v malém množství až do období před plodovou zralostí. Potom je množství vinné kyseliny stabilní, ale obsah kyseliny jablečné klesá. Za příznivých podmínek v období zrání je poměr jablečné a vinné kyseliny blízký 1:1. Vína z teplejších vinařských oblastí oplývají menším množstvím kyselin než vína ze severních oblastí. [37]

Výskyt **mléčné kyseliny** v hroznech je skoro bezvýznamný. Její produkci zabezpečují zejména kvasinky rodu *Saccharomyces veronae* nebo *cerevisiae*, kdy pro její vytvoření je zapotřebí přítomnosti alespoň 15 % koncentrované glukózy nebo fruktózy, aby bylo možné mluvit o nezanedbatelném množství produkované mléčné kyseliny. Tento typ kvašení v krátké době střídá alkoholové kvašení, při kterém se koncentrace sacharidů snižuje. Mléčná kyselina jako hlavní produkt jablečno - mléčné fermentace, na které se podílí mléčné bakterie, je výsledně obsažena ve víně v hodnotách 0,5 až 5 g/l. Význam má ve snižování kyselosti vína. [37]

**Jantarová kyselina** se nachází v nezralých hroznech v množství od 0,2 g/kg. Dozráváním hroznů její obsah klesá. [12] **Octová kyselina** ve vyšších koncentracích (0,7 - 1,1 g/l) způsobuje nepříjemnou chuť a vůni vína. Její tvorba a obsah závisí na kmenu kvasinek a množství octových bakterií. Vzniká také činností bakterií mléčného kvašení. [13,37] Octová kyselina je produkována kvasinkami jako meziprodukt glykolýzy. Ve formě acetyl-CoA vzniká z pyruvátu pomocí série enzymů (pyruvátdehydrogenázy, pyruvátdekarboxylázy, acetaldehyddehydrogenázy a acetyl-CoA syntetázy). Kmeny kvasinek rodu *Saccharomyces cerevisiae* dokáží vyprodukovat různá množství octové kyseliny (100 mg/l až 2 g/l). Nicméně nadměrné koncentrace octové kyseliny se objevují v důsledku působení divokých „nesaccharomycétních“ kvasinek a oxidací etanolu pomocí anaerobních octových bakterií. [13] Jako vedlejší produkt kvašení za anaerobních podmínek se vyskytuje v množství 0,3 až 0,6 g/l, kde se horní hranice považuje za symptom mikrobiologické nákazy hroznů, moštu nebo vína. Do uvedené spodní hranice působí pozitivně na ovocný charakter vína ve formě esterů octové kyseliny. [37]

#### 3.2.4.6 Polyfenoly

Polyfenoly často zahrnují označení tříslovin a barviva. Působí tedy na barvu, hořkost, jímavost kyslíku a průběh stárnutí moštu a vína. Podle způsobu reakce je lze rozdělit do 5 tříd, a to: 1. kyseliny fenolové, 2. flavonoly, 3. flavan-3-oly, 4. flavan-3,4-dioly, 5. antokyanidiny. Obsah polyfenolů v bílém víně za podmínek šetrného zpracování a opatrného lisování je množství pod 200 mg/l. Naopak zvyšování polyfenolů zapříčiňují naležení rmutu a silnější lisování. [36]



### **3.3 Vinifikace – výroba vína**

Termínem vinifikace rozumíme souhrn operací uskutečňujících přeměnu hroznů na víno. V případě, že bobule dosáhly plné zralosti, začíná sběr. Proces pokračuje zpracováním hroznů, zisk rmutu, ošetřováním kvasícího moštu, zpracováním výlisků a hlavním kvašením. [25]

#### **3.3.1 Příjem hroznů**

Z důvodů možné nekontrolované oxidace, vyluhování a mikrobiálního vývoje (octový zápach) uvolněné šťávy by se hrozny měly dopravit z vinic do místa zpracování nepoškozené. Do zpracovatelských podniků se sklizené hrozny dopravují v bednách, kádích, kontejnerech, přívěsech, návěsech a mlýnkoodzrňovacích návěsech (rozdrtí a odstopkuje hrozny již ve vinici) nebo polních lisech (hrozny se vylisují ve vinici, přepravuje se pouze mošt). Optimální způsob přepravy je doprava využívající gravitační pád, tedy když jsou hrozny dopravovány vlastní hmotností. I čerpadla, která jsou vůči hroznům šetrná, zvyšují podíl kalů o 0,5 – 1 %. Přijímají se tedy celé hrozny, rozdrčené hrozny, rmut (mlýnkoodzrňovací návěsy) nebo mošt (polní lisy). Pro dopravu hroznů je vhodná alternativa pásového dopravníku, na kterém hrozny vytrídí pracovníci. Obvykle je ale lepší třídít hrozny již ve vinici během sklizně. Pro šetrný příjem a dopravu se doporučují krátké dopravní cesty, postupy zpracování odshora dolů (samospádem), pásové dopravníky, hadicová čerpadla a velký průměr hadic nebo potrubí. [36]

Provádí se také kontrola hroznů vážením a měří se cukernatost moštoměrem. Cukernatost vyjádřená v °NM (normalizovaný moštoměr) udává množství cukru v kg/100 l moštu. Používané jsou i jednotky °Kl (Klosterneuburský moštoměr), které měří procentuální zastoupení cukru při 20 %. Cukernatost lze měřit také refraktometricky. [8]

#### **3.3.2 Zpracování hroznů**

Zpracování hroznů před lisováním probíhá ve velkovýrobě navazujícími procesy mletí, odzrňování a přečerpávání rmutu. [20] Způsob zpracování hroznů a získávání moštu ovlivňuje výsledný produkt z 80 %. [36]

##### **3.3.2.1 Drcení**

Po sklizni se hrozny drtí (rmutují) s cílem ulehčit lisování, zvýšit výlisnost a zabránit zapaření. Neměly by se poškodit semena, třapina a slupky bobulí, protože by se z nich mohli

vyluhovat nežádoucí látky (třísloviny, oleje, chlorofyl). Pro představu, z množství 100 kg hroznů se drcením získá 90 l rmutu. [34]

### 3.3.2.2 Síření

Přidání oxidu siřičitého má své opodstatnění s následujícími účinky: útlum aktivních oxidačních enzymů, útlum divokých kvasinek a bakterií a vyvázání vzdušného kyslíku. Cílem je chránit rmut před účinky vzduchu, zabránění hnědnutí a podpořit vývoj buketu. Nejčastěji se síření provádí pomocí prášku – pyrosulfitu draselného ( $K_2S_2O_5$ , disiřičitan draselný) a nejjednodušeji přímo na hrozny. Dávkování pro zdravé hrozny je 0 – 50 mg/l  $SO_2$  (podává se ve formě 1 % roztoku, tedy 0 – 5 g/hl) a 0 – 10 g/hl rmutu pyrosulfitu draselného. [36]

### 3.3.2.3 Naležení rmutu a scezování moštu

Uchování rmutu v nádobě před lisováním poskytuje vyluhování látek obsažených ve rmutu, čímž se zvyšuje obsah extraktu, buketních látek a barviv a vzniká více živin pro kvasinky v moštu. Scezování moštu se uskutečňuje krátce před lisováním se záměrem vystavit mošt nižší oxidaci v porovnání s přetékáním přes lis. [36]

### 3.3.2.4 Lisování

Lisováním hroznů se separují tuhé složky od kapaliny. Stupeň vylisování závisí na tlaku a charakteru lisovaného rmutu. Vlhkost, stupeň rozdrcení hroznů a typ lisovacího zařízení mají účinek na rychlost lisování. Důležitými aspekty jsou i odrůda vinné révy a stupeň vyzrállosti hroznů. V první části lisování uniká z lisovacího systému vzduch a tuhá fáze se stmeluje. Zvýšený tlak ovlivňuje zmenšení objemu a odtok kapalně fáze. Prudkým zvýšením tlaku se sníží výkon lisu. Tuhé složky prochází otvory lisu a mikročástice ucpávají póry, čím se odpor v lisu zvyšuje a odtok moštu brzdí. Z toho důvodu se v první části používá nižší tlak, který se pomalu zvyšuje. Tento postup zabezpečuje rovnoměrný odtok moštu a rychlejší vylisování. [20]

Druhy lisů podle způsobu práce rozlišujeme: plynulý (šnekové, pásové, pneumatické lisy) a přerušovaný (vertikální a horizontální lisy). Podle způsobu vytváření tlaku: mechanické, hydraulické, samotížné a pneumatické.

V případě, že je ze rmutu scezen již tekutý podíl, je možné využít kapacitu lisu až na 150 %. [36]

Pro výrobu bílého vína se mošt lisuje co možná nejdříve v lisu bez přístupu vzduchu. Naopak u červeného vína a jeho výroby se mošt nechává 6 dní v otevřených nádobách zakvasit, aby se

vyluhovalo z vnějších buněk slupky barvivo, a až potom se lisuje [25] Množství vylisovaného moštu ze 100 kg hroznů záleží od odrůdy, ročníku, vyzrálosti a způsobu lisování. Průměrně se udává hodnota 75 – 80 litrů moštu. [36]

Na lisování plynule navazuje sedimentace moštu, kdy jsou aktivní zejména kvasinky a vláknité houby. Plísně, bakterie a kvasinky v moštu pochází z povrchu hroznových bobulí. Součástí mikrobioty kvasinek jsou i pravé vinné kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae*. (O tomto druhu samostatně pojednáno v kapitole 3.4.3.1) [9]

### 3.3.3 Úprava moštu

V období mezi sklizní a kvašením se aplikují postupy rozhodující o budoucím charakteru a kvalitě vína. Tyto procesy souhrnně nazýváme úprava moštu. [36]

#### 3.3.3.1 Odkalení

Odkalování moštu se vykonává s cílem zlepšit kvalitu a zvýšit stabilitu mladých vín. Předcházející procesy zanechají v moštech zákaly jako úlomky slupek, třapiny, nevyvinutá semena, půdní částice, prach, atd., které jsou přenašeči mnoha pro víno škodlivých mikroorganismů a enzymů. [24] Kaly lze definovat jako úlomky slupek, dužiny hroznů, které se do moštu dostávají lisováním. [12] Složky kalů jsou nositeli reziduí chemických přípravků, které byly použity na ochranu vinné révy. Tyto částice jsou pro zdraví nebezpečné a také nepříznivě ovlivňují průběh kvašení. [20] Nevhodné komponenty by měly být odstraněny před kvašením, aby se zamezilo jejich nežádoucím účinkům. Nevyhnutelné je odkalení nahnilých hroznů a hroznů znečištěných hlínou. Doporučení stanovují snížit obsah kalů na maximum 0,6 % objemu (od 1 % jsou patrné nečisté tóny ve víně). Odkalení je možné dvěma způsoby:

a) Diskontinuální zahrnuje sedimentaci kalů v kádi, sudu nebo tanku a je doprovázena stočením čistějšího moštu. Sedimentace je účinnější v případě, že je mošt ponechán v klidu, nejčastěji se tak děje v noci. Podmínkou je, aby mošt nekvasil.

b) Kontinuální se především využívá ve velkovýrobách. Jde o odstředivkový způsob odkalení, tedy odstranění kalů odstředivou silou.

c) Flotace (diskontinuální nebo kontinuální) představuje úpravu tříslovin pomocí provzdušnění a přidání želatiny. Působením tlaku a plynu (dusík nebo vzduch) se vytvoří bublinky, které přilnou k částem kalů a spolu plavou na hladině. V případě kontinuálního způsobu se snímá pěna z povrchu průběžně, u diskontinuálního se čirý mošt vypouští

ve spodní části po krátké časové době (1/2 – 2 hodiny). Podstatně urychluje další zpracování. [36]

Obecně lze říct, že vína z odkaleného moštu jsou jemnější, harmonicky sladěná a méně náchylná na oxidaci, takže si udržují správný tón barvy. Odkalením se odstraní zákalové částice a velká část mikroflóry, takže odkalený mošt pomaleji kvasí. Také přidání čisté kultury kvasinek neumožní vyvolat intenzivní kvašení jako je to v případě neodkaldeného moštu. [12]

### 3.3.3.2 Úprava cukernatosti moštu

Mošty se doslazují hlavně v nepříznivých ročnicích, kdy hrozny nedosahují potřebné cukernatosti. Cukernatost se upravuje sacharózou (řepným cukrem) před začátkem kvasícího procesu. Pro zvýšení cukernatosti o 1 °NM je potřebné přidat přibližně 1,1 kg cukru na 100 l moštu. V případě použití Klosterneuburského moštoměru se pro zvýšení o 1 °Kl přidává asi 1,25 kg cukru na 100 l moštu. Množství jednoho kilogramu cukru zvýší objem moštu o 0,6 l. Jestliže je záměr zvýšit obsah etanolu o 1 %, je potřebné na 1 l upravovaného moštu použít 17 g sacharózy. [20] Maximální množství cukru pro doslazování je 4,25 kg cukru/hl, tedy o 2,5 % obj. nebo 3,2 °Kl. [36] Postup při úpravě cukernatosti začíná vypočtením a navážením dávky cukru, který se nasype do nádoby a smíchá s menším množstvím moštu z objemu, který má být docukřen. [20] Použití rektifikovaného moštového koncentráту (RMK) je také povolenou alternativou. RMK je vyráběn z hroznového moštu ochuzeného o vodu, kyseliny, aromatické látky, a tedy je zahuštěným cukerným roztokem. Není podmínkou, aby pocházel ze stejné vinařské oblasti jako upravovaný mošt. [36] Cukr se nesmí míchat s vodou nebo přidávat přímo do kvasné nádoby. Průměrně se kvalitní mošty doslazují maximálně na 21 °NM, mošty kvalitních odrůd nejvíce na 24 °NM. Přílišným cukřením se víno znehodnotí, vznikne silně alkoholické a neharmonické víno nebo víno se zbytkovým cukrem, který zastírá odrůdový charakter vína. Pro zachování odrůdového charakteru vína je vhodné cukernatost moštů upravit zahuštěným moštem. [20] Postupy pro zahušťování jsou vakuová destilace, reverzní osmóza a vymrazování vody. Doslazování probíhá jednorázovou metodou nebo vícenásobným přidávkem (stupňovité slazení). Jednorázová aplikace představuje výhodnější postup pro kvasinky, které se přizpůsobí novým podmínkám pouze jednou. Klidnější kvasící proces s menšími ztrátami buketu nabízí vícenásobný přídavek. Nevýhodou stupňovitého slazení je hrozba zastavení kvašení (v případě opožděného přidání cukru) a vyšší pracnost. Se stoupajícím počtem doslazování nebo řezáním doslazeným moštem se ztrácí právo na označení vína jako kabinet nebo víno

s přívlastkem (pozdní sběr, výběr, výběr z bobulí, samotok, výběr rozinek, ledové a slámové víno). [36]

### 3.3.3.3 Dokyselování moštu

Úprava kyselosti hroznového moštu se provádí za účelem vyrobit víno s harmonickým poměrem kyselin a ostatních složek. Odkyseluje se mošt mimořádně nepříznivých ročníků, v případě, že se nepředpokládá snížení kyselosti přirozeným způsobem (vyloučením vinného kamene a jablečno-mléčnou fermentací). [20] Nejdůležitějšími kyselinami v moštu jsou jablečná a vinná kyselina. V průběhu růstu a zrání hroznů se obě tyto kyseliny částečně odbourávají. Vinná kyselina se vysráží hydroxidem draselným na hydrogenvinan draselný a jablečná kyselina se bakteriemi rozštěpí na mléčnou kyselinu a víno má menší kyselost. Intenzita těchto procesů, hlavně štěpení jablečné kyseliny nelze předpokládat. [12] Odkyselení se provádí chemicky čistým uhličitanem vápenatým ( $\text{CaCO}_3$ ), hydrogenuhličitan draselný ( $\text{KHCO}_3$ ) nebo uhličitan vápenatý s malým množstvím podvojně vápenaté soli vinné a jablečné kyseliny. K výhodám odkyselování je možné zařadit nepatrné ovlivnění chuti včasným provedením, zůstatek vápníku ve víně a tím zachování harmonického a plnějšího vína, podpoření biologického odbourávání kyselin (zvýšení pH) a ušetření času v případě potřeby uvést víno do oběhu. Na druhé straně má i nevýhody, ke kterým se řadí zvyšování mikrobiologického rizika vadných tónů, změny barvy u červených moštů a podpora biologického odbourávání kyselin. Maximální odkyselení moštů by mělo být na 9 – 10 g/l. [36] Ošetřováním moštů a vín s nízkým obsahem kyselin je potřebné technologicky zamezit všem faktorům způsobujícím degradaci kyselin. Nízký obsah kyselin v moštech a vínech má vliv na mošty a vína ve smyslu neharmonické chuti, rychlého stárnutí a náchylnosti k bakteriálním onemocněním. Tyto je možné kyselit množstvím vinné kyseliny maximálně 2 g/l. Koncentrace kyselin ve víně se v ČR udává v přepočtu na množství kyseliny vinné. [20]

### 3.3.3.4 Ošetření bentonitem

Bentonit se využívá na odstranění „termolabilních“ bílkovin z moštu. Za výhody lze považovat lepší oddělení kalů, vína bez nečistých příchutí, klidnější kvašení bez vzniku pěny, nižší náchylnost k hnědnutí. Negativem mohou být vyšší náklady, problematické stanovení potřebného množství, pravděpodobnost snížení výživných látek pro kvasinky (aminokyseliny). Aplikace by se měla pohybovat v rozmezí 150 až 200 g/hl. Odstraní se v průběhu odkalení. [36] (Následuje alkoholové kvašení moštu, o kterém je pojednáno samostatně v kapitole 3.4)

### 3.3.4 Ošetřování a stabilizace vína

Pracovní postupy při přípravě vína od mladého až po lahvování zahrnuje název ošetřování a stabilizace vína. [36]

#### 3.3.4.1 Stáčení

Vyprázdněním původní nádoby s vínem a naplnění jiné nádoby po skončení kvašení s cílem odstranit usazené kaly od vína se jmenuje stáčení. Usazeniny mohou mít na víno převážně negativní vliv jako rozklad kvasnic a vznik sirky. Provzdušnění je žádoucí u červených a minimalizováno u bílých vín. [36]

#### 3.3.4.2 Síření

Stabilizace oxidem siřičitým se využívá ve všech fázích vinifikace. Inaktivuje oxidativní enzymy vázáním kyslíku, acetaldehydu a dalších látek, a tím zabraňuje hnědnutí vína. Funkce síření mají široké působení: oxid siřičitý působí konzervačně, ale má také pozitivní vliv na buket vína. SO<sub>2</sub> zvyšuje stabilitu a kvalitu vína redukováním mnohých látek (polyfenoly, antokyanová barviva, třísloviny). [20] Zabraňuje aktivitě divokých kvasinek a bakterií (bakterie mléčného a octového kvašení) a vyvázáním kyslíku chrání víno před oxidací (víno zůstává ovocné, svěží). [36] Dávkování a koncentrace je v dnešní době povolena maximálně 260 mg/l u bílého vína, 210 mg/l u červeného a vína s přívlastkem 300 – 400 mg/l veškerého SO<sub>2</sub>. [20]

#### 3.3.4.3 Čiření vína

Čiřící prostředky mají víceúčelové využití, uchovávají víno stabilní i skladováním v různých podmínkách a teplotách. [36] Samočiřící zdlouhavý proces vína nahrazují čiřící prostředky. Jde o zdravotně nezávadné, chemicky neutrální látky s vynikající adsorpční schopností. S rostoucím aktivním povrchem částic roste i adsorpční schopnost. [20]

Mladá vína se vyznačují jemným zákalem. Zdrojem tohoto zákalu jsou molekuly hroznových koloidů srážejících se na světle do podoby zákalu. (Částice, které se z vína vysrážejí a tvoří zákaly, mají záporný náboj. Slizovité látky a bílkoviny ve víně mají náboj kladný). [24] Prostředky pro čiření je možné rozdělit do dvou základních skupin, na čiřidla s kladným elektrickým nábojem – vaječný bílek, vyzina, želatina, a čiřidla se záporným elektrickým nábojem – agar, aktivní uhlí, kaolin, modré čiření, tanin a bentonit. [20] Bentonit je jílovitá hornina, která po okyselení za přítomnosti vinného kamene (hydrogenvinan draselný) přechází do stavu vyvločkování, kdy spolu se zakalenými částicemi sedimentují, čímž víno

čistí. [24] Čiřící prostředky lze použít jako suspenzi nebo jako součást filtrační vrstvy. Celý proces trvá 10 – 14 dní a sraženina, která vzniká, musí být kompaktní a málo objemová. Druh čířidla závisí na sraženině, bílkovinné zákaly (+) se číří zápornými a třísloviny (-) kladnými čířidly. Čiřené víno musí být v klidu, nesmí v něm probíhat kvasící procesy. Množství čířící látky se zjišťuje předběžnou zkouškou v litrových vzorcích vína. [20]

#### 3.3.4.4 Filtrace mladého vína

Filtrace představuje separaci pevných částic vína pomocí pórovitých stěn filtru. Filtrovat lze jenom vína dostatečně vyčiřená. [34] Čištění vína filtrováním je účinné pouze tehdy, když je velikost pórů menší než nejmenší částice zákalů. [20] Mezi filtrační materiály se řadí celulóza, křemelina (tvořena křemíkem a oxidem hlinitým) a perlit (tvořen křemičitanem hlinitým).

Tento proces se většinou zařazuje mezi poslední manipulace před lahvováním. Jejím cílem je dosáhnout stability čířého vína kombinací čířících metod a stabilizačních zásahů.

V současnosti se filtrace považuje za nejšetrnější a nejúčinnější fyzikální zásah v zájmu získat maximální stabilitu vína. [24]

#### 3.3.4.5 Vyzrávání vína

V průběhu filtrace mladých vín se začínají uskutečňovat zrající procesy (ty závisí od kultivaru, lokality, ročníku a technologie zpracování hroznů). Budoucí kvalitu vína ovlivňují chemické a biochemické proměny odehrávající se v mladém víně. Jde především o esterifikaci, oxidaci, následnou redukci, odbourávání kyselin a aminokyselin, koagulaci a krystalizaci. Mění se také obsah oxidu uhličitého. Ve víně se rychle snižuje a při nedůsledné aplikaci oxidu siřičitého víno získává pod vlivem oxidáz a vzdušného kyslíku nežádoucí příchut'. Oxidačně-redukční procesy nastávají, i bez přístupu kyslíku. [24]

Bílá vína dozrávají v průběhu pár měsíců, naopak vína červená vyzrávají za delší dobu, tedy 2 – 3 roky. [20] Vína zrají v sudech dubových, ocelových nebo železobetonových tancích. [34] Z dubových sudů vína absorbují vanilkové aroma a sladkou chuť. Většinou jsou využívány sudy o objemu 225 l, další možností jsou sudy o polovičním obsahu nebo naopak až o obsahu 600 l. [18]

#### 3.3.4.6 Stabilizace vína

Před samotným lahvováním (pár týdnů) by mělo být víno sensoricky ohodnoceno, zdali dosahuje vlastností pro danou jakost a odrůdu a zda nemá vady.

Hladina SO<sub>2</sub> by měla být delší dobu ustálená, proto se doporučuje nastavení obsahu volného oxidu siřičitého na hodnoty 30 – 50 mg/l. V případě nestabilních vín by se mohly v láhvích stát aldehydovými a oxidativními. Součástí opatření před lahvováním je i tepelná zkouška, ve které se hodnotí usazeniny a následná potřeba čiření. Dalším je test na obsah kovů (železo, měď), které způsobují kovové zákaly ve víně. [36] Kovy urychlují mikrobiologické a chemické procesy, ale v nadměrném množství jsou nežádoucí. [20] Kovové zákaly se odstraňují převážně modrým čiřením, tedy za použití hexakynoželeznanu draselného. Zabezpečit stabilitu vinného kamene (hydrogenuhlíčan draselný) má své opodstatnění, kvůli možnému vysrážení v láhvi. Jako preventivní postup se používá kyselina metavinná (5 – 10 g/hl), nebo se víno zchladí (na -4 °C na jeden týden). Víno připravené do láhví musí být čisté po předešlé filtraci. [36]

#### 3.3.4.7 Lahvování vína

Soubor operací plnění vína připraveného vyškolením do čistých, sterilních láhví se jmenuje lahvování. K plnění slouží lahvovací linky ve velkovýrobě, víno dále zraje v láhvích uložených v boxpaletách. Následně se láhve očistí z vnější strany, připraví se pro prodej a balí se do kartonů. [1] Pro plnění jsou využívány láhve různých typů, barev a velikostí. Běžně se víno plní do láhví s objemem 0,75 l, 0,5 l, 1 l a 2 l (vypsány nejčastěji využívané láhve, existuje i širší paleta nabídek). [12,36] Jako uzávěr láhve se nabízí více možností: přírodní korek, lisovaný korek, plastová zátka, korunkový uzávěr a šroubovací uzávěr. [36] Zátky musí být neškodné vůči vínu, musí zabránit vniknutí vzduchu do láhve, a tím oxidaci vína, nesmí se drolit, aby neznečistili víno. Doposud nejlépe vyhověly těmto podmínkám korkové zátky. [12] Víno v lahvách se skladuje za stálé teploty (bílá vína 10 – 12 °C, červená až do 15 °C), nízké vlhkosti vzduchu a krátkých dopravních cest od lahvování k expedici. [36]

### 3.4 Alkoholové kvašení

#### 3.4.1 Historie

Základní příčiny alkoholového kvašení objasnil v 17. století Johann Becker, který v roce 1669 dokázal, že kvasí pouze roztoky obsahující cukr, přičemž rozlišuje alkoholové a kyselé kvašení. Později v 18. století (konkrétně 1789) Lavoisier ve známém zákonu o zachování hmoty uvádí, že vykvašený cukr se změní na alkohol, oxid uhličitý a kyselinu. Studiemi z let 1810 a 1815 Gay-Lusac zpřesnil formulaci alkoholového kvašení, kde se jedna molekula



cukru štěpí na dvě molekuly alkoholu a na dvě molekuly oxidu uhličitého. Tato formulace platí dodnes jako vztah pro teoretickou výtěžnost:



Pasteur zkoumal přeměnu cukru na alkohol podrobněji a v roce 1860 dokázal, že během alkoholového kvašení vznikají kromě etanolu a oxidu uhličitého ještě vedlejší produkty, a těmi jsou glycerol a kyselina jantarová. Dokázal také, že část cukru byla spotřebována kvasinkami pro růst. [12] Kvasinky jako původci kvašení byly klasifikovány jako houby, konkrétně „cukrové houby“ – *Saccharomyces*. V tomto období se hledali metody, jak získat z jediné buňky kvasinky čistou kulturu, pouze ale pro potřeby pivovarnictví. [36] Začátkem 20. století se podařilo objasnit průběh procesů při alkoholovém kvašení. Prokázalo se, že během kvašení probíhají důležité enzymové procesy a tvoří se během nich mnoho vedlejších produktů. [12]

### 3.4.2 Proces kvašení moštu

Vylisovaný mošt je dopraven do nádob (tanků/sudů) umístěných ve sklepě, ve kterých začíná kvasit. Tato zařízení jsou vybaveny ventilem, aby mohl unikat vznikající oxid uhličitý a také pro udržení anaerobního prostředí. Mikroorganismy, které byly na slupkách hroznů, a lisováním prošli do moštu, zahajují kvašení. [25] Mošt kvasí v neplných nádobách při teplotě 15 °C v době 1 – 2 měsíce. [34]

Kvasící proces je realizován enzymatickým systémem kvasničné buňky. Děj je popsán rovnicí alkoholového kvašení (uvedena výše). [20] Z pohledu technologie rozlišujeme 3 fáze kvašení. První fáze je charakteristická množením kvasinek, ve druhé lze pozorovat bouřlivé kvašení a na to pak dokvašování ve fázi třetí. [24] Průběh reakcí při alkoholovém kvašení byl stanoven následovně:

- a) fosforylace cukru (vznik fosforečných esterů hexóz),
- b) štěpení fosforylovaného cukru na triózy (glyceraldehydfosfát a dihydroxyacetonfosfát),
- c) redoxní reakce trióz,
- d) defosforylace trióz (vznik pyrohroznové kyseliny),
- e) dekarboxylace pyrohroznové kyseliny (vznik acetaldehydu a oxidu uhličitého),
- f) redukce acetaldehydu (vznik etanolu). [12]

K hlavním produktům alkoholového kvašení se řadí oxid uhličitý a etanol. Oxid uhličitý má pozitivní vliv na sensoriku mladých vín s vyšším obsahem kyselin. Etanol má z mikrobiologického hlediska konzervační účinky. Podléhá zčásti oxidaci a zčásti se spotřebuje v prospěch tvorby sekundárního buketu (esterifikační reakce). [20] Jako vedlejší

produkty vznikají glycerol, jantarová kyselina, mléčná kyselina, 2,3-butandiol, octová kyselina, propionová kyselina, metyljablečná kyselina, dimethylglycerová kyselina. [12] V počáteční fázi kvašení vzniká glycerol, který je ze sensorického hlediska nositel měkkosti, dodává vínu viskozitu a chuťovou plnost. Mléčná kyselina může být původu kvasinkového nebo může vznikat enzymaticky z pyrohroznové kyseliny (redukcí). Octová kyselina má také dvojí způsob vzniku, a to činností octových bakterií, nebo oxidací acetaldehydu. Vyšší alkoholy kromě alkoholového kvašení vznikají i během zrání vín a mají příjemnou ovocnou vůni. Z pyrohroznové kyseliny nebo deaminací aminokyselin vznikají během kvašení. Z fyzikálního hlediska představuje kvasící proces exotermickou reakci. Štěpením glukózy se získává energie v podobě adenosintrifosfátu (ATP). Teplota je nejvyšší ve druhé, bouřlivé, části kvašení. Dochází také ke změně objemu, kdy objem kvašených cukrů je větší než objem vzniklého etanolu. [20]

### 3.4.3 Mikrobiota

Mikrobiotu moštu a vína představují kvasinky, bakterie a vláknité houby. Jednotlivá zastoupení těchto organismů závisí na zdravotním stavu hroznů. [20]

#### 3.4.3.1 Kvasinky

Kvasinky se řadí do říše *Funghi* – houby. Na základě pohlavního rozmnožování patří do oddělení *Ascomycota* (vřeckovýtrusné houby), *Basidiomycota* (stopkovýtrusné houby). Druhy, u nichž není známo pohlavní rozmnožování, patří do skupiny *Deuteromycota* (imperfektní houby), které patří k oddělení *Ascomycota*. [16] Mezi nejvýznamnější askomycétní druhy patří rod *Saccharomyces*, konkrétně druh *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasinky pochází z povrchu slupek a z půdy ve vinici. [36] Jejich tvary i velikosti jsou rozličné, typické pro jednotlivé druhy, ovlivněné prostředím a věkem kvasinek. [12] Délka buněk kvasinek se pohybuje mezi 4 – 10 mikrometry a šířka 4 – 6 mikrometrů. [20] Optimální podmínky pro kvasinky znamenají teplota 20 – 28 °C (pro rod *Saccharomyces* 4 – 8 °C) a dostatečně kyselé prostředí, což představuje pH 3 – 3,6. [20] Z biotechnologického hlediska je možné rozdělit kvašení do tří etap:

V první etapě se kvasinky rozmnožují a začíná kvašení. Etapa souvisí s klidovou fází kvasinek, která trvá 2 – 4 hodiny, kdy se buňky adaptují na prostředí a začínají pučet.

V etapě druhé probíhá bouřlivé kvašení moštu, neboli exponenciální čili logaritmická fáze. Tato fáze je charakterizována zvýšeným rozmnožováním a rastem buněk kvasinek,

za současné tvorby oxidu uhličitého a tepelné energie, pomocí které se mošt ohřívá často až na 25 – 28 °C. Bouřlivé kvašení trvá 7 až 14 dní.

Třetí etapa kvašení moštu se nazývá dokvašení, která souvisí s fází klidu kvasinek. Fáze se vyznačuje zpomaleným růstem buněk a počet nově vytvořených se přibližně rovná počtu odumírajících buněk. V tomto období se kvasný proces v moštu zpomalí a zpomaluje se i vývoj oxidu uhličitého. [12]

Jestliže v prostředí chybí určité látky, kvasinky jsou omezeny ve své činnosti. Tyto látky se označují jako aktivátory kvašení. Mezi nejvýznamnější aktivátory patří vitamíny skupiny B, různé minerální a organické látky. Inhibitory kvašení potlačují fermentaci kvasinek. Nevýznamnějším inhibítorem je etanol, dále enzymy rozkládající vitamíny, látky, se kterými vitamíny tvoří komplexy a látky, které jsou svojí strukturou podobné vitamínům. [12] Podle kvasícího výkonu a vzhledu se kvasinky rozlišují na:

- a) velmi dobře kvasící („ušlechtilé vinné kvasinky“ druhu *Saccharomyces cerevisiae*) tvoří velké množství alkoholu, v počáteční fázi kvašení jsou zastoupeny méně,
- b) slabě kvasící („divoké kvasinky“) v počáteční fázi mají mnohočetné zastoupení, zahajují kvašení,
- c) křísotvorné kvasinky – potřebují kyslík a víno škodí, množí se na hladině vína s nízkým obsahem alkoholu (11 % obj.). [36]

#### 3.4.3.1.1 Spontánní alkoholové kvašení

Během spontánního alkoholového kvašení se očekává namnožení kvasinek s využitím kyslíku na potřebný počet buněk. [20] U spontánního kvašení vždy začínají kvašení apikulátní kvasinky (*Kloeckera apiculata*). V moštu začínajícího kvašení je jich často až 90 %. Zkvašují glukózu a fruktózu, sacharózu ne, protože netvoří enzym invertáza. Mají velkou rozmnožovací schopnost a prokvašují víno až do 5 % obj. alkoholu. [12] Je možné uvažovat nad argumentem, že původní kvasinky z bobulí nejlépe zajišťují odrůdový charakter vína. V závislosti od podmínek (SO<sub>2</sub>, teplota, rezidua přípravků na ochranu rostlin, výchozí počet zárodků) se prosazuje jiný druh divokých kvasinek, takže výsledný efekt odrůdového charakteru je ponechán náhodě. Divoké kvasinky (např. *Hanseniaspora*, *Candida*) zkvašují rychle a vytváří velké množství glycerolu, ale negativem je nízká tolerance etanolu, kdy odumírají již při 4 % obj. [21,36] Během této koncentrace jsou potlačovány kvasinkami rodu *Saccharomyces*, které jsou odolnější vůči alkoholu. [12] Charakteristické pro spontánní kvašení je vyšší obsah glycerolu, větší množství vyšších alkoholů, těkavých kyselin, vyšší potřeba oxidu siřičitého, zůstatek zbytkového cukru (kvašení se samovolně zastaví). [36]

V případě využití spontánního kvašení by se měl mošt odkalovat pouze částečně, 3 až 4 hodiny (hrubé odkalení) a také je důležité zaměřit se na správné ošetření rmutu a moštu sířením. [30]

#### 3.4.3.1.2 Kvašení pomocí čistých kultur kvasinek

Jako čistá kultura kvasinek se rozumí kvasinky získané rozmnožením jedné buňky nebo spory. Pro vinařskou výrobu se používají následující selektované kmeny kvasinek:

- a) hlubokokvasící (do 16 – 18 % obj. etanolu) neboli odolné vůči vysoké koncentraci alkoholu, cukru a tvořící nízkou koncentraci těkavých kyselin,
- b) vhodné na výrobu šumivých vín, rezistentní vůči nižší fermentační teplotě a dobře sedimentující,
- c) sulfítové kvasinky netvoří sulfan, jsou odolné proti vyšší koncentraci oxidu siřičitého,
- d) chladnomilné kvasinky odolávají nízkým teplotám (8 – 10 °C),
- e) imunní vůči exogenním inhibitorům kvašení (pesticidy, těžké kovy), které brzdí kvasný proces. [20]

V případě, že je v moštu málo kulturních kvasinek rodu *Saccharomyces*, nestačí pokračovat v kvašení a začíná činnost bakterií mléčného nebo octového kvašení, které proces kvašení zcela znehodnotí. [12] Pro vyvarování takového směřování se přidávají do moštu selektované sušené kultury kvasinek. Od počátku kvašení je dosaženo dostatečného množství buněk a předejde se tím vzniku kvašení nežádoucím směrem. Velmi vhodné je využít způsob kvašení pomocí čistých kultur kvasinek v případě, že byl mošt pasterizován, má vysokou cukernatost, pochází z nahnilých hroznů, vyskytnou se problémy s kvašením v důsledku toxických látek, mošt je opětovně překvašován nebo druhotně kvašen, což se děje také v případě velmi nízkých teplot. [36]

Čisté kultury selektovaných kvasinek mají výhodu rezistence k oxidu siřičitému, čímž se nevyklučuje jejich používání současně, na rozdíl od divokých kvasinek, které jsou vůči oxidu siřičitému citlivé. Byly vyvinuty různé formy těchto čistých kultur, například lisované kvasinky nebo aktivní sušené kvasinky, případně tekutá forma. Sušená forma je stabilní a má dlouhou dobu skladování. Kvasinkové kmeny jsou pěstovány ve výzkumných ústavech a jejich identifikace a registrace probíhá podle specifického názvu. Zákvasy čistých kultur jsou běžné ve výrobě šumivých vín. [9] Preparáty aktivních suchých vinných kvasinek (ASVK) musí splňovat parametry požadované Mezinárodním úřadem pro révu vinnou a víno v Paříži. Používané přípravky AVSK musí pocházet z populace z hroznů, moštu nebo vína, s deklarací druhu a kmene kvasinek, maximální vlhkost vzorku preparátu nesmí překročit 8 %

jeho hmotnosti, počet živých buněk v 1 gramu preparátu nesmí klesnout pod hodnotu  $10^9$  ( $10^9 = 1$  miliarda) v rámci záruční lhůty, množství bakteriálních buněk v preparátu nesmí překročit  $10^5/g$  a musí tvořit do 0,01 % jiných kvasinek. Dávkování čistých kultur kvasinek je doporučeno výrobcí způsobem 10 – 40 g ASVK na 100 ml moštu. [20]

Výhody používání čistých kultur před původní mikrobiotou dle Minárika (1977) :

1. Prevence chorob vína – rychlý začátek kvašení a úplnost vykvašení cukru moštu, čímž se zabrání nežádoucí bakteriální aktivitě.
2. Urychlení sedimentace kvasničných kalů zrnitých aglomerací a vyčištění mladého vína, které vede k rychlejšímu stáčení z kalů.
3. Bezpečné odbourání jablečné kyseliny bakteriemi během dokvašení mladého vína a těsně po něm. [9]

Pro přípravu čistých kultur se využívají kvasinky například *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces bayanus* často označované jako ušlechtilé kvasinky. [12] Aplikace čistých kultur probíhá nabobtnáním sušených kvasinek ve vlažné směsi moštu a vína. Směs s kvasinkami se aktivně projevuje tvorbou pěny a poté se přimíchá do moštu, který se má prokvasit. Potřebné je zabezpečit vyrovnanou teplotu směsi a moštu a vyvarovat se hladovění kvasinek v směsi. [36]

*Saccharomyces cerevisiae* je nejvíc fermentující a nejtolerantnější druh vůči etanolu během alkoholové fermentace. Ovlivňuje také kyselost, kdy množství kyselosti produkované je obvykle nízké (od 0,25 do 0,50 g/l vyjádřeno kyselinou octovou). Během fermentace vysoko cukernatého média, kyselost může být přes 1,8 g/l nebo i vyšší. Právě množství kyselosti hraje značnou roli ve vinném aromatu. [4]

*Torulaspora delbrueckii* dříve nazývána také *Saccharomyces rosei* má pozitivní efekt na chuť a aroma alkoholických nápojů a vyznačuje se nízkou produkcí acetaldehydu, acetátu a etylacetátu. Kvůli vysoké fermentační čistotě se smíšením se *S. cerevisiae* používají jako způsob redukce obsahu kyseliny octové ve víně. *T. delbrueckii* je méně tolerantní k nízkým hladinám kyslíku v porovnání se *S. cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae*, v porovnání s *T. delbrueckii* má lepší stabilitu v průběhu produkce  $CO_2$ . (Stejně tempo udržují do koncentrace 15 g/láhev  $CO_2$ ). Vyniká také v délce alkoholické fermentace po inokulaci, je v průměru o polovinu rychlejší než *T. delbrueckii*. Možným důvodem je pomalejší růstová rychlost *T. delbrueckii*. [4]

Místo čistých kultur kvasinek lze na zakvácení moštu použít i směs čistých kultur. Izolace a kultivace kvasinek se provádí převážně jednotlivě a směs se tvoří až při přidávání do moštu.

[12] Aplikací směsných kultur vinných kvasinek připravených odděleně během kvašení sterilního moštu se uplatňují ty druhy, které se rozmnožují v první fázi kvašení (*Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces carlsbergensis*). Nejosvědčenější směsnou kulturou je *Torulasporea delbrueckii* (*Saccharomyces rosei*) se *S. cerevisiae* (*S. oviformis* nebo *S. carlsbergensis*). Vhodnými směsnými nebo sdruženými kulturami je možné ve vysoko cukernatém moštu dosáhnout hlubokého prokvašení s nízkou hladinou těkavých kyselin v porovnání s aplikací čistých kultur. [9] Názory na vhodnost směsných kultur se rozcházejí. Za výhodu se považuje výsledné víno s výraznějším buketem, naopak nevýhodou je převládání určitého kmene nebo kmenů a potlačení ostatních. Co se týče chemického složení vín zakvašených čistými kulturami nebo jejich směsmi, není zde žádný rozdíl. Směsi se zdají být vhodnější z hlediska přiblížení se přirozeným podmínkám při kvašení a lepší sladěností odrůdových vín po zakvašení směsnými kulturami. [12]

#### 3.4.3.2 Bakterie

Bakterie jsou jednobuněčné mikroorganismy různého tvaru (kulaté, tyčinkovité, spirálovité). Průměr kulovitých bakterií je 0,5 – 1,0 mikrometru, délka tyčinkovitých bakterií 2 – 10 mikrometrů a šířka 1 – 2,5 mikrometru. Optimální teploty pro bakterie je široké, do 20 °C pro psychrofilní, od 20 °C do 40 °C pro mezofilní a nad 40 °C pro termofilní. [20] Bakterie je z technologického hlediska možné rozlišovat jako užitečné, zlepšující víno (jejich účinkem probíhá jablečno-mléčná fermentace) a škodlivé (vyvolávají nežádoucí mikrobiologické změny ve víně). [12] Z důvodu nízkého pH, tedy kyselého prostředí se ve vinařství uplatňují pouze octové a mléčné bakterie. Octové bakterie reprezentují rody *Acetobacter* a *Pseudomonas* (obě G-). Rod *Acetobacter* má schopnost oxidovat etanol na octovou kyselinu. Mléčné bakterie představují rody *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Lactobacillus* (všechny G+). Kvašením cukrů a degradací kyselin získávají potřebnou energii. [20] Bakterie mléčného kvašení se rozdělují na homofermentativní (*Pediococcus*) a heterofermentativní (*Leuconostoc*). Homofermentativní bakterie přeměňují 95 % glukózy nebo jiných sacharidů na mléčnou kyselinu. Kromě mléčné kyseliny vzniká také oxid uhličitý a těkavé kyseliny. Činností heterofermentativních bakterií vzniká navíc etanol, octová kyselina, glycerol a kyselina mléčná je pouze jedním z hlavních produktů, které se vytváří ze sacharidů. [12]

##### 3.4.3.2.1 Vliv prostředí na bakterie

Mléčné bakterie se nejlépe rozmnožují při pH 3 až 4. Rast a rozmnožování ve velké míře ovlivňuje teplota. Většina bakterií ve víně roste už za teploty 15 °C, přičemž optimum růstu

a rozmnožování má za teploty 25 °C a jejich činnost se zastavuje prakticky až při 40 – 45 °C. Mléčné a octové bakterie jsou citlivé na obsah oxidu siřičitého, v množství nad 50 mg/l jsou inhibovány. Podle schopnosti využívání kyslíku se rozdělují na aerobní, které pro svou činnost potřebují kyslík a na obligatorní anaeroby (octové bakterie), pro které je kyslík jedem. Bakterie rostoucí v přítomnosti i bez kyslíku se jmenují fakultativní anaeroby (mléčné bakterie). [12]

#### 3.4.3.2 Vliv činnosti bakterií na víno

Za pozitivní změny se považují snižování obsahu jablečné kyseliny vlivem mléčných bakterií a zvýšení obsahu mléčné kyseliny. Účinkem jablečno-mléčné fermentace víno získá jemnou, harmonickou chuť. Nežádoucí je produkce těkavých kyselin, změny v obsahu vinné kyseliny a glycerolu, které nastanou účinkem mléčných bakterií. Degradace vinné kyseliny probíhá při vyšších hodnotách pH, tedy u vín s nižší kyselostí a teplotách 25 °C. Působení octových bakterií je vždy pro víno nepříznivé. Jako inhibitory octových bakterií fungují: vyšší obsah etanolu, volný oxid siřičitý (30 – 50 mg/l), přiměřená nízká teplota skladování vína (12 – 15 °C). [12]

#### 3.4.3.3 Plísně

Plísně, kvasinky a bakterie spolu vytváří mikrobiotu hroznů během vegetace. Výskyt plísní lze pozorovat na stěnách sklepů, sudů a zařízení, a také často neodbornou činností vznikají v dřevěných nádobách na víno. [12] Plísně vytváří viditelné vláknité útvary (hyfy), které společně tvoří mycelium. [20] Systematicky lze plísně rozdělit do tří velkých tříd:

- a) *Fungi imperfecti (Deuteromycetes)*,
- b) *Phycomycetes*,
- c) *Ascomycetes*.

Z vinařského hlediska je důležitá hlavně plíseň *Botrytis cinerea*, která se řadí do třídy *Ascomycetes*. Tato plíseň se projevuje dvojitým účinkem. [12] Pokud napadá nezralé hrozny bobule, projevuje se jako šedá hniloba s využitím více cukrů a méně kyselin. Napadením zralých bobulí způsobuje ušlechtilou hnilobu a přednostně degraduje kyseliny. [20] Mycelium plísně *Botrytis cinerea* napadá slupku bobulí hroznů, narušuje jí, a tím umožňuje silnější vypařování vody z dužiny. Obsahuje pektolytické enzymy (využívané pro přípravu enzymových pektolytických preparátů pro čištění moštů) a oxidační enzymy (např. polyfenoloxidáza, která způsobuje i hnědnutí vína). Vlivem *Botrytis cinerea* se štěpí řada primárních aromatických látek ve slupkách hroznů, přičemž se tvoří jiné aromatické buketní

látky. Význam dalších plísní z třídy *Ascomycetes* pro vinařství mají rody *Aspergillus* a *Penicillium*. [12] Napadají a způsobují kontaminaci výlučně poškozeným bobulím. Škodlivé typické mycelium vytváří „zelenou hnilobu“. Kromě hroznů kontaminují oba rody i sudy na víno a vinařská zařízení. Houby z rodu *Penicillium* napadají korkové zátky a v lahvovém víně navozují těžko odstranitelnou pachut'. [20] Z třídy *Phycomycetes* se na hroznech a stěnách sklepů vyskytuje pouze čeleď *Mucoraceae*, rody *Mucor* a *Rhizopus*. [12] Hyfy plísně rodu *Mucor* se v moštu rozpadají na kulatá oidia, které zkvašují sacharózu do 4 – 5 % obj. etanolu za vzniku glycerolu, acetaldehydu a organických kyselin. [20] Plíseň z rodu *Rhizopus* se nachází v půdě a na hroznových bobulích. Růst plísně v moštu zastavuje již 1 až 2 % obj. etanolu, takže v kvasícím moštu se již nevyskytuje. [12]

### **3.4.4 Faktory ovlivňující alkoholové kvašení**

#### 3.4.4.1 Teplota

Kvasinky jsou mezofilní mikroorganismy, a proto jejich nejvýznamnější životní projevy lze zaznamenat v rozmezí teplot 20 – 30 °C. [20] Za optimální teplotu pro množení buněk a kvašení se považuje teplota kolem 25 °C. Látková výměna kvasinek je citlivá na větší výkyvy od této hodnoty, je bržděná. Pro prevenci tepelného stresu kvasinek by se měla teplota měnit nejvíc o 4 °C za hodinu. [36] U bouřlivého kvašení teplota vzrůstá a také se zvyšuje riziko bakteriální kontaminace, riziko ztráty etanolu a buketních látek vypařováním. Preventivně lze opatřit mošt před vysokými teplotami rychlým zpracováním hroznů, sířením moštů, odkalením a zakvašením čistými kulturami kvasinek. [20] Za příliš vysokých teplot kvašení (35 – 37 °C) může dojít k úplnému zastavení kvašení (uvaření). [36] Přerušování kvašení vysvětluje tvorba vysokomolekulárních látek, které inhibují růst a rozmnožování kvasinek. Účinkem vznikajícího etanolu zesláblé kvasinky nenachází v rozkvašeném moštu dostatek růstových látek. [20] Druhým extrémem se vyznačuje „studená fermentace“ (12 – 15 °C), která je možná pouze aplikací speciálních studenomilných kvasinek. Pozitivní účinky studené fermentace jsou čistota mladých vín v chuti i vůni, protože se při nízkých teplotách nerozmnožují nežádoucí kvasinky ani bakterie octového, mléčného kvašení, dále ve vínech zůstává více buketních látek a také obsah alkoholu je vyšší (méně se ho odpaří). Za nedostatky studeného kvašení se považuje pomalé kvašení a tím potřeba vyšších dávek SO<sub>2</sub>, chladičů zařízení. [36]



#### 3.4.4.2 Cukernatost moštu

Nízká cukernatost moštů kvasí bez větších potíží. V opačném případě mošty s vysokou cukernatostí prokvašují v důsledku vysokého osmotického tlaku hůře. [36] Mošt hroznů představuje prostředí s vyšším osmotickým tlakem v porovnání s tlakem cytoplazmy kvasinek. Se zvyšujícím se množstvím cukru v moštu se zvyšuje i tlak v prostředí, zpomaluje se kvašení a snižuje se výtěžek alkoholu. [20] Následně mošt odnímá vodu z kvasinek, čímž jednak snižuje jejich množení a buňky kvasinek se smršťují, zastavují se enzymové reakce buňky a nastává deformace buněčné stěny. [20,36] V případě kvašení moštů pro vína s přívlastkem musí mít kvasinky dobrou schopnost prokvašení a musí snášet vysokou cukernatost (být „osmotolerantní“). [36]

#### 3.4.4.3 Obsah alkoholu

Jak již bylo zmíněno, silně kvasící kvasinky rodu *Saccharomyces* jsou tolerantní vůči alkoholu. Schopnost množení se vyznačuje ještě do hodnot 12 až 13 % obj., prokvašení končí u hodnot 15 až 16 % obj. etanolu. *Saccharomyces bayanus* mají vyšší rezistenci vůči alkoholu v porovnání se *Saccharomyces cerevisiae*, a proto většinou provádí závěrečné dokvašení. Tlumící účinek etanolu na množení a kvašení se využívá u výroby sladkých vín (Portské, Sherry). Docílením žádané hodnoty zbytkového cukru se kvašení zastaví dodáním vinného alkoholu. [36]

#### 3.4.4.4 pH

pH při kvašení pro životnost kvasinek se pohybuje v rozmezí 2,5 – 6,5. [20]

#### 3.4.4.5 Siřičitá kyselina

Přidáním siřičité kyseliny ( $H_2SO_3$ ) lze ovlivnit pouze začátek kvašení, ne průběh. Siřičitá kyselina ztěžuje množení kvasinek, hlavně divoké kvasinky a bakterie, méně kvasinky rodu *Saccharomyces*. Účinnost siřičité kyseliny je ovlivňována hodnotou pH v prostředí. [36] S kyseljším prostředím (nižším pH) roste účinek  $H_2SO_3$  na kvasinky. [20]

#### 3.4.4.6 Obsah kalů

Pro klidné a řízené kvašení by se měly kaly z moštu odstranit (do 0,6 % obj.). Kalové částice podporují uvolňování  $CO_2$ , což vede ke stimulaci kvašení. [36] Na částičky kalu přilnou kvasinky a intenzivně zkvašují cukr. Odkalením se odstraňuje kromě kalů také velká část kvasinek, zbytek jich sedimentuje na dno nádoby, oxid uhličitý uniká pomaleji, hromadí se,

a tím brzdí kvašení. [20] Mošt se pak neohřívá tak značně a vznikají vína bez postranních tónů. Zvyšuje se zisk alkoholu a aromatu, u příliš pomalého kvašení se zvyšuje i obsah acetaldehydu a následně oxidu siřičitého. [36]

#### 3.4.4.7 Ostatní nežádoucí látky

Schopnost fermentace kvasinek rodu *Saccharomyces* výrazně zpomaluje octová kyselina už při koncentraci 1 g/l. Používání pesticidů zpomaluje kvašení na počátku, hlavně sirné a měďnaté fungicidy. [20]

### 3.5 Malolaktická fermentace

#### 3.5.1 Historie

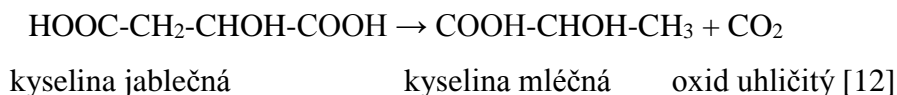
Malolaktická fermentace byla popsána jako druhá fermentace v roce 1837 německým enologem Freiherrrem von Babo, kdy také objasnil příčinu rostoucí zakalenosti ve víně. Von Babo povzbudil výrobce vín k rychlé reakci na tuto aktivitu stáčením vína do nového sudu, přidáním oxidu siřičitého, následným stáčením a přidáváním oxidu, aby bylo víno stabilizované. V roce 1866 Louis Pasteur izoloval první bakterie z vína a určil, že všechny bakterie ve víně způsobily znehodnocení vína. Zatímco si Pasteur všiml redukce kyseliny mléčnými bakteriemi, nezaznamenal proces spotřeby kyseliny jablečné bakteriemi, ale spíše předpokládá vysrážení vínanu. [6]

German a P. Kulisch v roce 1889 poprvé zavedli jejich biologickou povahu, přestože Pasteur ji naznačil už dříve. Od té doby byla malolaktická fermentace široce studována v různých částech světa. Kulisch si myslel, že odůvodňujícím organismem jsou kvasinky, ale Müller-Thurgau v roce 1891 ukázal, že transformace je zapříčiněna bakteriemi. Alfred Koch byl první, který v roce 1900 izoloval jablečno mléčné bakterie, poté vyvolal malolaktickou fermentaci naočkováním vína těmito bakteriemi. Objasnění celkové malolaktické rovnice bylo vytvořeno panem Moeslingerem v roce 1901.

Francouzský enolog Jean Ribéreau-Gayon v roce 1930 publikoval doklady o tom, že bakterie jsou prospěšné v bakteriální transformaci vína. Během 50. let 20. století byl zaznamenán pokrok v enzymové analýze, která umožnila enologům lépe porozumět chemickým procesům následujícím po malolaktické fermentaci. [6]

### 3.5.2 Proces malolaktické fermentace

Synonyma pro malolaktickou fermentaci jsou biologická nebo bakteriální degradace a jablečno-mléčné kvašení, které vzniká ve víně nejčastěji po kvasném procesu nebo už ve fázi dokvašení. [20,36] Činností mléčných bakterií se odbourává ve víně jablečná kyselina a vzniká mléčná kyselina a oxid uhličitý, který z prostředí uniká. [12,20] Tento proces je žádoucí, protože se částečně zmírní kyselost vína. [12] MLF může probíhat různými metabolickými drahami, podle rovnice:



V období dokvašení se prostředí obohacuje o růstové látky, jako dusík a vitamíny, kyselost vína se snižuje v důsledku vysrážení vinného kamene. Uvedené podmínky v prostředí umožňují za optimální teploty rychlé rozmnožování mléčných bakterií a začátek odbourávání kyselin. Jablečná kyselina není vhodným zdrojem uhlíku, a tedy během štěpení na mléčnou kyselinu nezabezpečuje dostatek energie pro mléčné bakterie. Proto je potřebné zabezpečit prostředí, kde je minimální množství cukrů (2 g/l) a citronové kyseliny (0,3 g/l) v mladých vínech. [20]

Významná je jablečno-mléčná fermentace v severních vinařských oblastech, kde se hrozny a mladá vína vyznačují vyšší koncentrací jablečné kyseliny. [20] K příznivým vlivům MLF patří snížení kyselosti vín, harmonizace poměru kyselin, etanolu a zbytkového cukru, nižší potřeba SO<sub>2</sub> (10 – 15 mg/l) a mikrobiální stabilita. [20,36] Ve vínech s nízkým obsahem kyselin je snaha zabránit průběhu MLF rychlejším stočením vína z kvasničných kalů, filtrací a silnějším sířením. [12] Jablečno-mléčné kvašení je heterofermentativní proces a kromě mléčné kyseliny se tvoří také vedlejší degradační produkty, které částečně zastírají odrudový charakter vína. [20] Negativní účinky MLF způsobují u nevyzrálých vín s vysokým podílem jablečné kyseliny vznik velkého množství produktů s nepříznivými vlivy v sensorice (tón po kyselém zelí), u červených vín dochází ke ztrátě barvy, riziko nežádoucí bakteriální činnosti a následné negativní ovlivnění chuti vína. [36]

Pro zahájení biologického odbourání kyselin je nutné dosažení potřebného množství zárodků. Existuje více možností pro zahájení odbourání: počkat na přirozené množení po dokvašení, míchání s vínem, ve kterém již odbourávání kyselin probíhá, přidání kvasnic z vína po odbourání kyselin, nebo přidání čistých kultur bakterií zahajujících odbourávání kyselin. V dnešní době se používají zmrazené startovací kultury bakterií v rámci řízené MLF. [36] Začátek MLF je charakterizován prioritní rostoucí fází mléčných bakterií, což se běžně děje

po alkoholové fermentaci. Tradiční praktiky spoléhají na růst přirozené mikroflóry, která podněcuje MLF spontánně. [14]

### **3.5.3 Regulace malolaktické fermentace**

#### **3.5.3.1 Spontánní malolaktická fermentace**

Spontánní (neřízené) kvašení probíhá samovolně, přičemž se do moštu kromě šíření nijak nezasahuje. [12] Fermentace je řízená přirozenou mikrobiotou a iniciují ji nesaccharomycetní rody *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea* a *Zygosaccharomyces*. Vyznačují se vysokou růstovou rychlostí a bohatou enzymatickou výbavou (glukosidázy, esterázy, lipoxázy, proteázy, pektinázy, glukonázy). Enzymy rychle mění chemické složení moštu a tím působí na aromatické vlastnosti vína. „Nesaccharomycetní“ mikrobiota se uplatňuje, pouze do tolerance alkoholu o koncentraci 4 % obj. Následně štafetu probírá rod *Saccharomyces*, v poslední fázi konkrétně *Saccharomyces cerevisiae*. Jednotlivé druhy tohoto rodu se liší schopností zkvašovat a asimilovat jednotlivé sacharidy. S rostoucí koncentrací alkoholu postupně omezí činnost i odolnějších mikroorganismů (platí i pro „ušlechtilé“ kvasinky) a proces spontánní fermentace se zastaví. [3] Důležitým činitelem je uskutečnění neřízeného kvašení pouze v moštích ze zdravých hroznů, za normálních podmínek, tj. přiměřená teplota při sběru, zdravé hrozny a vylisovaný mošt s přiměřeným množstvím kulturních kvasinek, případně mošty s vyšším obsahem cukru. [12] Spontánní MLF zahrnuje několik hrozeb, jako značný nárůst těkavých kyselin (produkovaných „nesaccharomycetními“ druhy kvasinek), spotřeba zbytkových cukrů a formace nežádoucích metabolitů (biogenní aminy, které ovlivňují lidské zdraví a vedou ke snížení kvality vín). [19] Problémy nastávají pouze v případech, kdy byl mošt silně slazen, nebo byl spontánně kvasící mošt z chybných hroznů, tedy napadených révou plísní, hnilobou, případně poškozených hmyzem nebo krupobitím. [12] Drsné fyzikálně-chemické podmínky kvasících moštů jako nízké pH, vysoký obsah alkoholu a přítomnost oxidu siřičitého vytváří stresové prostředí pro růst mléčných bakterií. V těchto podmínkách není neobvyklé selhání MLF. Právě pro vyvarování před těmito nepříjemnostmi byly vyvinuty technologie startovacích kultur mléčných bakterií. [14] Kmeny startovacích kultur pro komerční aplikace by měli mít dvě důležité vlastnosti, a to hlavně přizpůsobivost na výrobní proces a lepší smyslové a fermentační vlastnosti. [26] Co se týče plnohodnotnějšího buketu, plnějších vín a nenarušené odrůdové charakteristiky jsou tyto znaky výraznější u vín pocházejících z moštů kvašených spontánně. Důvodem jsou

právě „nesaccharomycetní“ kvasinky, které za určitých podmínek mohou mít pozitivní vliv na vývoj chutě a aroma vína. Tento způsob je vždy riskantní a ekonomicky nejistý. [3]

### 3.5.3.2 Řízená malolaktická fermentace

Částečná kontrola neboli řízená MLF funguje na principu přidávání čistých kmenů mléčných bakterií. [12] Výběr je možný z více druhů:

1. *Lactobacillus plantarum* je přidáván před kvašením kvůli jeho citlivosti na etanol. Žádoucí vlastností této mléčné bakterie je absence nežádoucích tónů po odbourání kyseliny. Nevýhodou je časné zastavení činnosti bakterií s rostoucí koncentrací alkoholu. V případě, že se jablečná kyselina neodbourá úplně a víno je lahvované v nedostatečně sterilovaných láhvách, vzniká hrozba mikrobiální nestability.

2. *Oenococcus oeni* (dříve *Leuconostoc oenos*) je bakterie přidávána během dokvašení s cílem využít teplotu kvašení. Důležité je vhodné načasování přídavku bakterií do moštu, protože vyšší koncentrace cukrů (>15 g/l) brzdí činnost bakterií a vzniká nežádoucí tvorba octu a nepříznivých aromatických látek. Startovací kultury se pohybují v množství 3 až 4 miliony buněk/ml a namnožením se zvyšuje desetinásobně. [36] *Oenococcus oeni* je nejvhodnější druh bakterie pro MLF, protože toleruje kruté fyzikálně-chemické podmínky (nízké pH, vysoký obsah alkoholu a přítomnost oxidu siřičitého) přítomné ve víně. Proto jsou kultury *O. oeni* používány pro přímou inokulaci za účelem zjednodušení řízení MLF. [35] Aplikace startovacích kultur kmenů mléčných bakterií selektovaných z vína původní mikrobioty každého regionu využívá přírodní adaptaci kmenů vinné charakteristiky a může současně zachovat jednotlivé zvláštnosti regionů. Zlepšení v kvalitě a rychlosti MLF jsou často připisovány použitým startovacím kulturám. Pro identifikaci individuálních kmenů zodpovědných za MLF se využívají molekulární metody. Inokulace malolaktickými kulturami vždycky generovali pochybnosti o skutečném zásahu přidaných mléčných bakterií. Efektivnost těchto komerčních starterů byla posuzována mnoha vinaři tím, že MLF začala pár dní nebo týdnů předtím v zaočkovaných tancích v porovnání s kontrolními (nezaočkovanými), anebo zda bylo zmizení kyseliny mléčné rychlejší. Genetická typizace je nezbytná pro identifikaci určitého druhu během MLF, a vyhodnocení zásahu starterů ve víně na analytické a senzorické úrovni. Efektivní inokulace selektovanými bakteriemi redukuje metabolismus aminokyselin, a tedy snižují risk formování biogenních aminů. [19]

Biomasa se přidává před kvašením moštu, během kvašení, případně po skončení kvašení, tj. spotřebování cukru kvasinkami. Proces je těžké řídit a regulovat, protože nestačí pouze ovládat růst mléčných bakterií, ale je také zapotřebí kontrolovat případné vytváření

nežádoucích látek. Problémem je ztráta aktivity bakteriální biomasy časem. Pro dobrý průběh se doporučuje inokulace  $10^7$ /ml buněk, protože v nižších koncentracích se růst zpomaluje a MLF opoždí. Jedna z příčin poruch jablečno-mléčné fermentace může být vysvětlena působením bakteriofágů, kteří napadnou kmeny *Oenococcus oeni* a náhle dojde k zastavení MLF. Toto napadení může zapříčinit činnost a rozvoj bakterií *Pediococcus* jako nežádoucích bakterií tvořících více vedlejších produktů ve víně. [12]

### 3.5.4 Faktory ovlivňující malolaktickou fermentaci

Doporučená teplota pro dokvašení je v rozmezí 18 – 20 °C. [20] Hodnoty pH 3,0 jsou nevhodné pro množení bakterií rodu *Oenococcus oeni*, při pH 3,4 se mohou množit nejen žádoucí, ale i nepříznivé bakterie rodu *Pediococcus*. Za optimální pH se považuje hodnota 3,1 – 3,4, kdy lze v případě potřeby zvýšit pH mírným odkyselením za použití uhličitanu vápenatého. Vína by neměla obsahovat volný oxid siřičitý, pouze vázaný oxid siřičitý do 50 mg/l. [36] Kyselejší vína se doporučují sířit slabými dávkami  $\text{SO}_2$ . [20] Množství zbytkového cukru by se mělo pohybovat do 20 g/l. [36] Obohacení vína o růstové činitele (vitaminy skupiny B) podporující rozmnožování a metabolismus mléčných bakterií lze ponecháním vína ležet na kvasnicích nebo promícháváním se zdravými kvasnicemi. [20]

#### 3.5.4.1 Vliv kvasinek na růst mléčných bakterií a malolaktickou fermentaci

Potenciální interakce mezi kvasinkami použitými pro řízení alkoholové fermentace a schopnosti mléčných bakterií růst a realizovat MLF mají důležitý vliv v rozsahu od zpomalení, přes neutrální až po stimulační efekt. Tyto interakce závisí na více faktorech jako na kombinaci kmenů kvasinek a bakterií, zavádění a uvolňování živin kvasinkami a schopnosti kvasinek produkovat metabolity, které jsou zároveň stimulatory anebo toxické pro mléčné bakterie ( $\text{SO}_2$ ). Vzájemné působení vede k následujícím zjištěním: některé kmeny kvasinek mohou uplatnit obě reakce vůči mléčným bakteriím, a to jak inhibiční tak stimulační, dále kompozice moštu a výroba vína může ovlivnit interaktivní efekty kvasinek na mléčné bakterie a některé mléčné bakterie mohou být inhibitory vůči vinným kvasinkám. [14]

Inokulace moštu mléčnými bakteriemi ve stejném čase jako kvasinkami může způsobit slabý nárůst bakterií, omezenou degradaci jablečné kyseliny, opoždění alkoholické fermentace a s tím spojenou nízkou produkci alkoholu kvasinkami a také zvýšená produkce octové kyseliny v konečném produktu. Přidání bakterií na konci alkoholické fermentace vytváří jinou řadu problémů. Víno v tomto stádiu je často ochuzené o nutrienty a koncentrace etanolu je

vysoká. Obě vlastnosti mohou způsobit značné zpoždění MLF. Bakterie očkovány do vína po alkoholové fermentaci profitují z přítomnosti mrtvých kvasinkových buněk. [6] Oxid siřičitý je přidáván do vína jako antioxidant a pro prevenci růstu nežádoucích mikroorganismů. Jeho koncentrace by neměli být příliš vysoké (do 100 – 150 mg/l), protože může inhibovat mléčné bakterie během MLF. [32]

### **3.5.5 Ukončení malolaktické fermentace**

Stanovením jablečné kyseliny se používá pro ujištění, že je proces biologického odbourání kyselin ukončen. Není doporučeno ihned po ukončení MLF víno sířit a čířit, je vhodné vyčkat 2 – 3 týdny kvůli redukování aroma vzniklého po odbourání. Víno nesmí oxidovat, z čeho vyplývá, že nádoby musí být plné. [36]

### **3.5.6 Vliv malolaktické fermentace na složení vína**

Malolaktická fermentace neznamena pouze dekarboxylaci jablečné kyseliny na mléčnou kyselinu a oxid uhličitý. Využíváním vína jako substance pro růst mléčné bakterie odstraní některé prvky vína a produkují jiné jako výsledek jejich metabolismu. K mechanismům, kterými bakterie mohou ovlivnit chuť a aroma vína se řadí již zmíněné odstranění aromatických sloučenin metabolismem a adsorbci do buněčné stěny, produkce nových sloučenin z metabolismu cukrů, aminokyselin a dalších látek a metabolismus a modifikace sekundárních metabolitů odvozených od kvasinek a hroznů na konečné produkty s vyšším sensorickým dopadem. Metabolická aktivita mléčných bakterií neovlivňuje pouze aromatické sloučeniny vína pocházející z ovoce a alkoholové fermentace, ale také dodává biologickou stabilitu finálnímu produktu. Nárůst mléčných bakterií je obecně podporován tam, kde je MLF vyžadována pro redukování kyselosti vína. Redukce kyselosti je prospěšná pro kvalitu vína vyráběného v chladných oblastech, protože hrozny přirozeně obsahují vysoké koncentrace organických kyselin. V mnoha případech je důležité dokončit MLF rychle, aby se ušetřil čas, a aby se docílila stabilita vína. Vliv MLF na sensorické vlastnosti vína závisí na faktorech jako je bakteriální kmen, různá intenzita aroma a použité vinifikační techniky. [6]

## 3.6 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

### 3.6.1 Princip chromatografie

Chromatografie se řadí k metodám separačním. Zaobírá se oddělováním jednotlivých složek ve vzorku a funguje jako kvantitativní a kvalitativní analýza vzorku. Sestává ze dvou vzájemně nemísitelných fází, stacionární (nepohyblivá) a mobilní (pohyblivá). Mezi tyto dvě fáze je umístěn vzorek, na začátku stacionární fáze, pohybem mobilní fáze se vzorek přemísťuje. Během tohoto pohybu se některé složky zachytávají na stacionární fázi. Tento proces představuje separaci jednotlivých složek, přičemž na konci stacionární fázi zůstávají složky dříve méně zadržované. [15] Povystoupení složek z kolony se zachytí na detektoru a zaznamená se pík. [22] Kvalitativní analýza probíhá identifikací látky podle maxima píku v chromatogramu. Kvantitativní analýza udává, že růst plochy píku a jeho výška odpovídá růstu obsahu složky ve vzorku. Plocha píku se určuje triangulací (proložení trojúhelníku píkem a změření šířky, výšky, výpočet plochy) nebo kvadraturou (proloží se obdélník), případně elektronickými integrátory, které jsou součástí moderních přístrojů. [23] Organické kyseliny ve víně lze stanovit pomocí různých metod, například enzymatickou metodou, elektroforézou nebo chromatografií. [11] Analýzou těchto kyselin lze dosáhnout kontroly procesu zrání hroznů a vývoje kyselosti vín během procesu jejich zpracování, tedy alkoholového kvašení, jablečno-mléčné fermentace a procesu stárnutí. [39]

### 3.6.2 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografické metody lze rozdělit do různých skupin:

1. Podle skupenství mobilní fáze:

- a) kapalinová chromatografie,
- b) plynová chromatografie.

2. Podle uspořádání fází:

- A) Kolonová chromatografie se stacionární fází umístěnou v trubici.
- B) Plošná chromatografie, kdy je stacionární fáze součástí chromatografického papíru (papírová ch.) nebo je stacionární fáze součástí pevného plochého podkladu (tenkovrstvá ch.).

3. Podle děje, který probíhá:

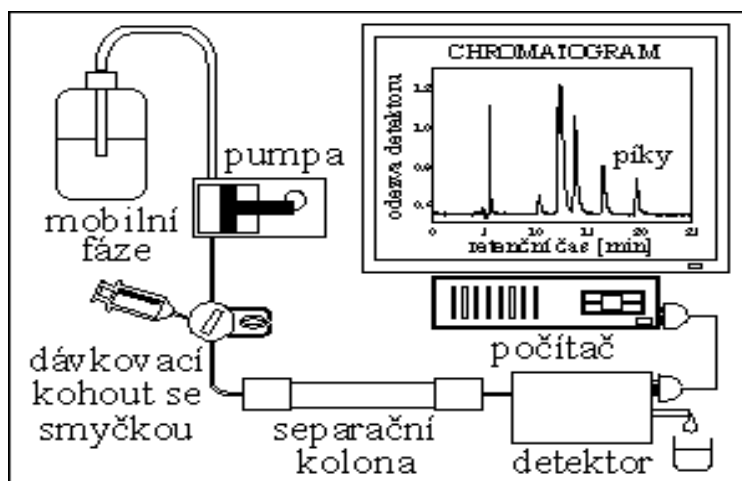
- I. Adsorbční chromatografie – dle rozdílné schopnosti složek poutat se na povrch stacionární fáze,



- II. Separační chromatografie – dle různé rozpustnosti složek vzorku ve stacionární a mobilní fázi,
- III. Iontově výměnná chromatografie – dle odlišných elektrostatických přitažlivých sil mezi funkčními skupinami stacionární fáze a ionty vzorku,
- IV. Gelová chromatografie – dle velikosti na pórovité stacionární fázi,
- V. Afinitní chromatografie – dle schopnosti stacionární fáze vázat jen složky, ke kterým má selektivní vztah. [27]

### 3.6.3 Kapalinová chromatografie

Kapalinový chromatograf funguje na principu naplnění skleněné trubice (délka 0,5 m a průměr 2 cm), zakončenou kohoutem, zrnitým sorbentem s velkým průměrem částic (např. oxidem hlinitým). Zrnitý sorbent by měl být dostatečně malý, aby kapalině vytvářely dostatečný odpor, proto se pracuje při vysokém tlaku. Do horní vrstvy se nadávákuje malé množství vzorku a následně se přidává mobilní kapalná fáze. Gravitační síla zabezpečuje pohyb mobilní fáze kolonou, separaci složek a jejich opouštění kolony. Detektory HPLC se vyznačují selektivitou pro analyty a malou citlivostí na mobilní fázi. Jako výsledek měření se zobrazí chromatogram s příslušnými píky, jejichž plocha je přímo úměrná koncentraci stanovované kyseliny. [15]



Obr. 1. Schéma kapalinového chromatografu (45)

## **4 Materiál a metodika**

### **4.1 Odrůdy vín - vzorky**

Pro výrobu vín v České republice je povoleno používat pouze odrůdy hroznů zapsané v Státní odrůdové knize. [7]

#### **4.1.1 Bílé měřené odrůdy**

##### 4.1.1.1 Chardonnay

Odrůda pochází z Burgundska, vhodná pro výrobu suchých vín a také pro výrobu šumivých vín. Výraz vína je odlišný v závislosti na klimatických podmínkách a vlastnostech půdy.

##### 4.1.1.2 Müller Thurgau

Nejlepší víno je mladé víno Müller Thurgau, s nižším obsahem alkoholu, s přiměřeným obsahem kyselin, ovocnou vůní a šťavnatostí. [2]

##### 4.1.1.3 Sauvignon

Odrůda Sauvignon dává velmi aromatická vína. Na aromatickosti vín se podílejí hlavně tioly a metoxypyraziny přítomné v hroznech. [29]

##### 4.1.1.4 Rulandské bílé

Rulandské bílé je vhodné jak pro šumivá vína, tak ro zrání v malých dubových sudech barrique. Vyznačuje se zralostí kyseliny a při řízeném kvašení si uchovává jemnou květovou vůni. [2]

##### 4.1.1.5 Veltlínské zelené

Vína odrůdy Veltlínské zelené jsou charakteristické svým mandlovým buketem, s příjemnými kyselinami. Je také vhodná pro výrobu šumivých vín. [29]

#### **4.1.2 Modré měřené odrůdy**

##### 4.1.2.1 Frankovka modrá

Tradiční odrůdou pěstovanou ve střední Evropě je Frankovka. Cukernatost u kvalitních vín z této odrůdy se pohybuje kolem 23 °NM. Obsahují více kyselin a mají intenzivní barvu. [31]

#### 4.1.2.2 Modrý Portugal

Modrý Portugal se vyznačuje květinovou vůní. Speciální technologií lze vyrobit příjemné mladé víno, které se na trhu objevuje pod názvem „Martinské víno“ v den svátku sv. Martina.

#### 4.1.2.3 Rulandské modré

Velmi stará odrůda Rulandské modré je určena hlavně pro produkci přívlastkových vín. Vína jsou vhodné pro dlouhodobé skladování, kvůli svojí plnosti, která zráním stoupá. [2,29]

#### 4.1.2.4 Svatovavřínecké

Bobule mají menší vybarvenost a vysoký obsah kyselin. Barva Svatovavříneckých vín je výrazná až tmavě červená. [29]

#### 4.1.2.5 Zweigeltrebe

Chuť vín Zweigeltrebe je závislá na objemu sklizně. Omezené sklizně poskytují vína barevná, plná a po vyzrání jemná. Obsah třapiny může vytvořit trpkost ve víně. [2]

V této práci byly použity vzorky vín vyráběných v Zámeckém vinařství Bzenec s.r.o. v době od 22. 10. 2015 do 8. 12. 2015. Vzorky (uvedeny v přílohách, tabulkách 1 a 2) prošli po odběru (s odstraněním oxidu uhličitého, kvůli skreslování výsledků) analýzou zahrnující stanovení pH, celkové titrovatelné kyseliny, těkavé kyseliny a stanovení organických kyselin metodou HPLC.

## 4.2 Přístroje a chemikálie

### 4.2.1 Přístroje měření

- elektronická laboratorní váha AND HA- 180M (AND Company, Japonsko)
- kapalinový chromatograf HPLC YL9100 (Young Lin Instrument Co., Korea)
  - dávkovací ventil Autosampler YL 9150
  - vakuový degasser YL9101
  - kvarténní vakuová pumpa YL 9110
  - kolonový termostat YL 9130
  - kolona NUCLEODUR C18 Pyramid (Macherey-Nagel, Německo)
  - UV/VIS detektor YL 9120
  - PC s vyhodnocovacím programem Clarity (YL, Korea)

#### **4.2.2 Použité chemikálie**

- deionizovaná voda
- acetonitril pro HPLC (Sigma – Aldrich, USA)
- ortho-fosforečná kyselina 85% pro HPLC (Sigma – Aldrich, USA)
- standardy:
  - vinná kyselina (ChemService – West Chester, USA)
  - jablečná kyselina (ChemService – West Chester, USA)
  - mléčná kyselina (ChemService – West Chester, USA)

#### **4.3 Hodnocení vína**

Hodnocení vína představuje posouzení složení a kvality nápoje. [20] Kvalitu vína určuje komplex určitých vlastností, které mají uspokojit spotřebitele. Hodnocení kvality vína je cílevědomá činnost probíhající v období tvoření vína a nakonec vyvrcholí oficiálním komisionálním hodnocení. Pro dosažení objektivního hodnocení vína se používají tři metody:

1. senzorické hodnocení kvality vína,
2. fyzikálně-chemické metody,
3. obsah bílkovin, železa, mědi, draslíku a vápníku, protože tyto látky zapříčiňují ve víně zákal. Jako doplňková metoda se používá také mikrobiologická kontrola. [12]

##### **4.3.1 Senzorické hodnocení**

Senzorická analýza vína neboli degustace, případně ochutnávka vína znamená hodnocení kvality smyslovými orgány. [20] Senzorickým hodnocením se víno posuzuje zrakem, čichem a chutí. Hodnocení probíhá formou číselných zápisů, přičemž celková jakost a harmonie vína se rozloží na více pocitů v souznění všech smyslových vjemů, které se následně bodově vyhodnotí. Sčítáním jednotlivých bodů se získá číselné vyjádření kvality vína. [12]

###### **4.3.1.1 Posouzení zrakem**

Zrakem se posuzuje čistota (jiskřivé, čiré, se závojem, mírně zakalené až kalné), barva (bezbarvé, zelenkavé, žlutozelené, slámově žluté, zlatožluté, hnědavé, ryšavé u bílých vín) a hustota (řidké, normálně husté, olejovité, slizovité) tichých vín. Barva a vzhled charakterizují odrůdu a věk vína. [20]

#### 4.3.1.2 Posouzení čichem

Účinkem těkavých látek na čichovou sliznici je vyvolán pocit známý pod pojmem vůně. Vhodná teplota pro posuzování vůně vín je v rozmezí 6 – 20 °C. [20] Pro zesílení vnímání těkavých látek je možné dosáhnout pozvolným kroužením neplně skleničky. Uvolnění aromatických látek v studených vínech lze mírným zahřátím. [12] Posuzováním vína čichem se rozeznává také odrůda, věk a zdravotní stav vína. Degustací by měly být odhaleny primární (hroznový), sekundární (kvasný) a terciární (ležácký) buket. Dle intenzity vůně se vína označují jako: bez vůně, neutrální, nevýrazná, jemná, hroznová, příjemná, výrazná, zvětralá a vadná. [20]

#### 4.3.1.3 Posouzení chutí

Podle chuti se posuzují jednotlivé složky vína a jejich vzájemný poměr. Nejsilnější vjem vzniká, když víno přijde do styku se všemi chuťovými pohárky uloženými na jazyku převalováním vína v ústech. [12] Chuťové buňky charakterizují z vína jeho věk, zdravotní stav, obsah extraktu, cukru, oxidu uhličitého, tříslovin a etanolu. [20] Víno z hlediska chuti se posuzuje podle více kritérií, může být: mladé, zralé, staré, mdlé a zvětralé. V souvislosti s obsahem extraktu se používají odborné názvy: prázdné, lehké, plné, těžké. Z hlediska obsahu cukru se označují vína jako: úplně prokvašená (suchá), nasládlá, sladká, velmi sladká. Podle stupně kyselosti se rozlišují vína fádňí, měkké, jemné, kyselé, výrazně kyselé. Z pohledu chutnosti vína a obsahu alkoholu je vína možné označit jako slabá (9 – 10 % obj. alkoholu), středně silná (10 – 12 % obj. alkoholu) a silná (12 – 14 % obj. alkoholu). [12] Celková chuť vína klasifikuje jako: pitelná, lahodná, harmonická, pěkná, natrpklá, trpká, neharmonická a drsná. [20] Sensorickou analýzou chuti vína se zjišťují také případné chyby a vady vín. Takové vyjadřují označení vína jako víno s cizím nádechem, s nečistou vůní po sulfanu, po plísni, myšíně, octu apod. Chuťové hodnocení má při bodování nejvyšší důležitost, protože vína s příznivým chemickým složením a slibnou vůní mohou být v chuti nepříjemné. [12]

### 4.3.2 Fyzikálně-chemické metody

Analytický rozbor posuzuje, zda víno odpovídá zákonným požadavkům a dalším požadavkům z hlediska stability vína při uvádění do oběhu. [36] Hotové víno je složené z těkavých a netěkavých látek. Voda, alkoholy, těkavé kyseliny a buketní látky se řadí k látkám těkavým. Celkový extrakt vína a netěkavé látky tvoří cukry a ostatní necukerné složky. Necukernatý extrakt je charakterizován spalitelným a nespalitelným (popel) podílem. Kyseliny, třísloviny,

bílkoviny, pektiny, tuky, enzymy, vitaminy a barevné látky představují spalitelnou část. K popelu patří minerální látky. Hustota vína je ovlivňována mnoha látkami, jako kyseliny a cukry, které hustotu zvyšují, anebo obsah alkoholu hustotu snižuje. Orientační rozmezí hodnot hlavních složek českých přírodních vín zjištěných dlouholetými výzkumy jsou uvedeny následovně: etanol se nachází v koncentračním rozpětí 10,0 – 14,6 %, hodnota pH kolísá mezi 2,4 – 4,0. Koncentrace zbytkového cukru se pohybuje od 0,3 do 21,4 g/l a celkový extrakt v hodnotách 20,6 – 74,6 g/l, z čeho bezcukernatý extrakt tvoří 16,6 – 44,3 g/l. Titrovatelné kyseliny byly prokázány v koncentracích 3,7 – 9,6 g/l, těkavé kyseliny 0,18 – 1,20 g/l. Popel se vyskytuje v hodnotách 1,1 – 5,4 g/l. [20]

#### **4.3.3 Kontrola stability vína vůči zákalům**

Bílkoviny jsou nejčastější příčinou zákalů vína, proto je víno potřebné před lahvováním zjistit jeho stabilitu. [12] V případě pozitivního testu vína na bílkoviny se do malých množství vína (100 ml) přidají různé dávky bentonitu. Úspěšnost aplikace se vyhodnotí novým testem na bílkoviny a tak se určí potřebná dávka bentonitu. [36] Vyšší obsah železa než 3 mg/l zapříčiňuje dodatečné železité zákaly v lahvovém víně. Pro stanovení obsahu železa ve víně funguje metoda na základě barevného rozlišení. [12]

#### **4.3.4 Mikrobiologická kontrola**

Ve finálních vínech mohou vznikat zákaly vlivem sekundární fermentace, dále vlivem jablečno-mléčné fermentace a vlivem chorob. Všechny mikrobiologické zákaly se projeví senzoricou změnou vlastností vína.

Převážná většina mikrobiologických zákalů je způsobena sekundární fermentací. Tento druh fermentace vzniká ve vínech se zbytkovým cukrem, které za příznivých podmínek dokvašují. Běžným ošetřením vín a filtrací není možné zabránit sekundární fermentaci. Zda je víno náchylné na sekundární fermentaci, závisí od množství kvasničných buněk ve víně. Čím více kvasničných buněk, tím větší pravděpodobnost sekundární fermentace. Pro zabránění tohoto jevu se používá metoda bakteriologické filtrace a sterilní plnění, dále je možné použít pasterizaci.

Jablečno-mléčná fermentace vín s nízkým obsahem kyselin, které se nechávají delší čas na kvasničných kalcích a málo se síří, jsou také náchylné na zákaly vlivem mléčných bakterií. Rozvoji jablečno-mléčných bakterií je možné zabránit jejich inaktivací a sířením.

Během zpracování hroznů a výroby vína se mohou vyskytnout chyby, které následně zapříčiní vady a choroby vína. Mezi nejznámější choroby zapříčiněné mikroorganismy patří octovatění,

rozvoj nežádoucích mléčných bakterií a máselné kvašení ve víně. Mikrobiálním zákalům lze předejít správným ošetřením vín, inaktivací mikroorganismů pomocí pasterizace a přidáváním chemických prostředků. [12]

#### **4.4 Stanovení organických kyselin metodou HPLC**

Vinná, jablečná a mléčná kyseliny jsou separovány na křemenné koloně s fází C18. Jednotlivě jsou kyseliny detekovány pomocí UV-VIS detektoru. Standardy i vzorky byly proměřovány při vlnové délce 254 nm. Kolona byla použita NUCLEODUR C18 Pyramid o rozměrech 25 cm x 4,4 mm, 5 µm. Jako mobilní fáze byla použita směs kyseliny fosforečné a acetonitrilu. Vymývání látek probíhalo za teploty 35 °C, průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min. Celková doba analýzy jednoho vzorku trvala 20 minut.

##### **4.4.1 Měření standardů**

Jako standard byl připraven roztok, kdy bylo naváženo 0,6040 g standardu vinné, jablečné a mléčné kyseliny s přesností 0,0001 g. Kvantitativně byla navážka převedena do 100 ml odměrné baňky a doplněna po rysku destilovanou vodou, čímž se získal zásobní roztok organických kyselin s koncentrací 6,4 g/l. Následně byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 a 6,4 g/l. Jednotlivě byly tyto kalibrační roztoky analyzovány, vyhodnoceny a z těchto údajů byly sestaveny kalibrační křivky pro jednotlivé kyseliny.

##### **4.4.2 Stanovení organických kyselin**

Každý vzorek byl naředěn (vodou v poměru 1 : 5) a filtrován. Vzorek byl pomocí autosampleru nastříknut na kolonu. Jednotlivé píky byly přiřazeny ke kyselinám pomocí retenčních časů. Vzory výsledků chromatografu jsou uvedeny v přílohách jako obr. 3., obr. 4., obr. 5.).



Obr. 2. Kapalinový chromatograf HPLC YL 9100

## 5 Výsledky a diskuze

### 5.1 Kalibrační měření a nejistoty HPLC

Správnost metody je stupeň, do kterého se stanovená hodnota analytu představuje přijatou referenční hodnotu. Přesnost metody vyjádřená směrodatnou odchylkou představuje těsnost výsledků a výsledků zkoušek získaných za definovaných podmínek. Interval spolehlivosti vystihuje rozmezí, ve kterém se nachází hodnota hledaného parametru. Nejistota měření odpovídá intervalu variability výsledků měření po zvážení všech vlivů na měření. (53) Nejistota měření organických kyselin přístrojem HPLC YL 9100 je 3 %.

### 5.2 Měření organických kyselin

Organické kyseliny (vinná, jablečná, mléčná) byly měřeny přístrojem HPLC YL 9100, metodou popsanou v kapitole 4.4. Jednotlivé hodnoty naměřených organických kyselin ve vzorkách odrůd jsou zobrazeny v přílohách (Tab. 1., Tab. 2.). Formy kvasů byly různého charakteru, v podobě přírodní mikrobioty nebo komerčních kmenů aplikovány do dílčích moštů již zmíněných odrůd vín. Obchodní názvy komerčních produktů kvasinek a bakterií, případně přírodní mikrobioty jsou uvedeny v tabulce Tab. 3.



Tab. 3.

Odrůda	Obchodní název Bakterie / kvasinky	Bakterie	Kvasinky
CH, RB, VZ	Vitalactic F / Zymaflore RX 60	<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sg, ZW	-	Přírodní mikrobiota	
RM	Viniflora oenos LS / Zymaflore Alpha	<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Torulaspora dellbrueckii</i>
FR, MP, SV	Lalvin T / Zymaflore RX 60	<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> subsp. <i>bayanus</i>

Kvasinky během fermentace nezpracovávají vinnou kyselinu. Tato kyselina figuruje pouze ve formě vinného kamene (0,5 – 1,5 g/l) vysráženého z důvodu obsahu alkoholu ve víně a její obsah je tedy snížený v porovnání s původním množstvím (před fermentací). Jablečná kyselina je kvasinkami zpracovatelná. Přeměňují jablečnou kyselinu při fermentaci, přičemž vzniká alkohol, ne mléčná kyselina, jako je to u biologického odkyselení. Zámecké vinařství Bzenec s.r.o. nezahrnuje ve své technologii výroby bílých vín biologické odbourávání kyselin, je tedy možné usoudit, že mléčná kyselina vznikala činností kvasinek.

Výrazně se změnil obsah jablečné a mléčné kyseliny u červených vín. V případě červených vín bylo aplikována řízená malolaktická fermentace. Jablečná kyselina je původcem nepříjemné drsné chuti vín, v porovnání s mléčnou kyselinou, která víno zjemňuje a zakulatňuje. Bakterie *Oenococcus oeni* odbourávají jablečnou kyselinu a vzniká mléčná kyselina. Změny jablečné kyseliny (pokles) a mléčné kyseliny (nárůst) se objevily u všech vzorků již po 4 dnech po inokulaci vína a po 6 dnech u moštů s přirozenou mikrobiotou. Tendence změn koncentrací kyselin byla ukončena zhruba 20 dní po inokulaci a 25 dní u přirozené mikrobioty.

Komerční Zymaflore Xpure kvasinky pro červená vína zlepšují čistotu aroma (díky nízké produkci sírových sloučenin SO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S). Přispívá k snížení rostlinného charakteru a podporuje ovocný výraz a aromatickou svěžest. Zymaflore Alpha se používá pro lepší kontrolu obsahu těkavých kyselin v bílých odrůdách, minimalizaci SO<sub>2</sub> a kontrolu vzniku nežádoucích mikroorganismů. V použité odrůdě červeného vína tyto kvasinky stabilizovali sytou červenou barvu vína. Zymaflore RX 60 je významný pro vysokou produkci čerstvého hroznového a bobulového aroma.

## 6 Závěr

Organické kyseliny ve víně mají značný vliv na organoleptický charakter a stabilitu vyráběných vín. Cílem práce bylo sestavit z literárních zdrojů přehled zahrnující technologii výroby vína, využití různých kmenů kvasinek a jejich vliv na výslednou kvalitu produktu. Byla popsána malolaktická fermentace, její vliv a význam, následně byly provedeny pokusy se zohledněním vlivu délky vinifikace a použití jednotlivých zákvasových kultur.

Z výsledků lze usoudit, že po provedení sensorického hodnocení a analýzy naměřených fyzikálně-chemických dat, se hypotéza delší vinifikace a přidavku čisté kultury do moštů potvrdila. Přídavek komerčních kultur v porovnání s původní mikrobiotou urychlil malolaktickou fermentaci a uspokojivě snížil množství kyseliny jablečné, což se projevilo i v organoleptických vlastnostech vína. Přirozená mikrobiota byla z časového hlediska opožďujícím faktorem pro jablečno-mléčné kvašení. To ale neovlivnilo sensorické hodnocení vín, kde byl sice zůstatek jablečné kyseliny u bílé odrůdy Sauvignon vyšší, ale v konečném harmonickém posouzení působil tento aspekt příznivě.

V konečném důsledku lze vyhodnotit přidávání jednotlivých komerčních produktů jako příznivé z hlediska řízení malolaktické fermentace a uspokojivé z hlediska sensorického. Zároveň není nutno považovat přirozené, spontánní kvašení za nežádoucí, nýbrž riskantní proces prokvašení vzhledem k časové náročnosti a také sensorické jakosti, kdy není zaručen opakovaně optimistický výsledek.

## Seznam použitých symbolů a zkratek

AVSK	aktivní suché vinné kvasinky
FR	Frankovka modrá
G+	grampozitivní bakterie
G-	gramnegativní bakterie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CH	Chardonnay
JAR	Jihoafrická republika
° Kl	Klosterneuburský moštoměr
MLF	malolaktická fermentace
MP	Modrý Portugal
MT	Müller Thurgau
° NM	stupeň normovaného moštoměru
RB	Rulandské bílé
RM	Rulandské modré
RMK	retifikovaný moštový koncentrát
Sb.	Sbírka
Sg	Sauvignon
SV	Svatovavřínecké
tj.	to je
ZW	Zweigeltrebe

## Zdroje

- [1] Ackermann, P. 2003. Vinařský slovník. Radix. Praha. 336. ISBN: 80-86031-34-9.
- [2] Anonym. Odrůdy. Znovín Znojmo a.s. se sídlem v Šatově. Dostupné z <  
<http://www.znovin.cz/odrudy> >
- [3] Baroň, M., Strapina, Z. 2013. Vliv různých metod zákvasu moštů na parametry vína. Vinařský obzor. 106 (2). 88-90.
- [4] Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D. 2008. Impact of mixed *Torulasporea delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. International Journal of Food Microbiology. 122 (3). 312-320.
- [5] Boekhout, T., Robert, V. 2003. Yeasts in food: beneficial and detrimental aspects. Hamburg. 488. ISBN: 80-7157-647-6.
- [6] Bou, M., Brown, N., Costello, P., Degré, R., Dietrich, W., Gertsen-Briand, S., Kollar, S., Krieger, S., Kyne, A., Loubser, P., Morenzoni, R., Palacios, A., Powell, Ch., Scully Specht, K., Specht, G., Theodore, D., Van Zandycke, S. 2005. Malolactic fermentation in wine. Lallemand. Montréal. 164. ISBN: 0-9739147-0-X.
- [7] Callec, Ch. 2002. Velká encyklopedie vína. Rebo productions. Praha. 512. ISBN: 80-7234-245-2
- [8] Čepička, J. 1995. Obecná potravinářská technologie. VŠCHT. Praha. 246. ISBN: 80-7080-239-1
- [9] Dědek, M., Benešová, L., Šmejkalová, Z. 1984. Mikroorganismy a čisté kultury v průmyslu potravin. Středisko technických informací potravinářského průmyslu. Praha.
- [10] Douša, M. 2013. Validace analytických metod. [cit. 2013-04-04]. Dostupné z <  
<http://hplc.cz> >
- [11] Escobal, A., Gonzales, J., Iriondo, C., Laborra, C. 1997. Liquid chromatographic determination of organic acids in txakoli from Bizkaia. Food Chemistry. 58 (4). 381-384.
- [12] Farkaš, J. 1983. Biotechnológia vína. Alfa. Bratislava. 978.
- [13] Furdíková, K., Malík, F. 2007. Vplyv kvasiniek na aromatický profil vína. Kvasný průmysl. 53 (7-8). 215-221.
- [14] Hervé, A., Costello, P., J., Remize, F., Guzzo, J., Guilloux-Benatier, M. 2004. *Saccharomyces cerevisiae-Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. International Journal of Food Microbiology. 93 (2). 141-154.
- [15] Klouda, P. 2003. Moderní analytické metody. Klouda Pavel. Ostrava. 132. ISBN: 978-80-86369-07-5.

- [16] Kopecká, J., Matoulková, D., Němec, M. 2012. Kvasinky a jejich využití. Kvasný průmysl. 58 (11-12). 326-335.
- [17] Kraus, V. 2012. Pěstujeme révu vinnou. Grada. Praha. 128. ISBN: 9788024734651
- [18] Kuttelvašer, Z. 2003. Abeceda vína. Radix. Praha. 296. ISBN: 80-86031-43-8
- [19] López, I., López, R., Santamaria, P., Torres, C., Ruiz-Larrea, F. 2008. Performance of malolactic fermentation by inoculation of selected *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains isolated from Rioja red wines. *Vitis*. 47 (2). 123-129.
- [20] Malík, F. 2003. Ze života vína. Filip Trend Publ. Pardubice. 221. ISBN: 80-86282-27-9
- [21] Malík F., Volleková, A., Vollek, V. 1999. Ekológia vínnych kvasiniek. Kvasný průmysl. 45 (5). 123-126.
- [22] Meyer, V. 2010. Practical high performance liquid chromatography. John Wiley and sons Ltd. Chichester. 426. ISBN: 978-0-470-68218-0
- [23] Mikeš, O. 1980. Laboratorní chromatografické metody. Nakladatelství technické literatury. Praha. 673.
- [24] Minárik, E., Navara, A. 1986. Chémia a mikrobiológia vína. Príroda. Bratislava. 547.
- [25] Müller, G., Lietz, P., Münch, H., D. 1983. Mikrobiologie pflanzlicher Lebensmittel. Fachbuchverlag. Leipzig. 388. ISBN: 978-3642875021
- [26] Nan, L., Jinting, D., Dawei, G., Jianhua, L., Ruiyu, Z., Yanhong, B., Xuwu, B., Bingshuo, J. 2015. Mutation and selection of *Oenococcus oeni* for controlling wine malolactic fermentation. *European food research and technology*. 240 (1). 93-100.
- [27] Nováková, L., Douša, M. 2013. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. Lucie Nováková. Praha. 300. ISBN: 9788026042433
- [28] Pavloušek, P. 2006. Výroba vína u malovinařů. Grada Publishing a.s. Praha. 100. ISBN: 80-247-1247-4.
- [29] Pavloušek, P. 2007. Encyklopedie révy vinné. Computer press. Brno. 316. ISBN: 978-80-251-1704-0
- [30] Porubský, P. 2013. O spracovaní hrozna, čírení muštu, kvasnom procese a ošetrení mladých vín. Víno a vinárstvo. [cit. 2013-10-09]. Dostupné z < <http://vinoavinarstvo.sk/index.php/vyroba-vina/29-o-spracovani-hrozna-cireni-mustu-kvasnom-procese-a-osetreni-mladych-vin> >
- [31] Pospíšilová, D. 1981. Ampelografia ČSSR. Príroda. Bratislava. 345.
- [32] Reguant, C., Carreté, R., Constantí, M., Bordons, A. 2005. Population dynamics of *Oenococcus oeni* strains in a new winery and the effect of SO<sub>2</sub> and yeast strain. *FEMS Microbiology Letters*. 246 (1). 111-117.

- [33] Ribéreau-Gayon, P. 2000. Handbook of enology. Wiley. Chichester. 512. ISBN: 978-0-470-01034-1
- [34] Rop, O., Hrabě, J. 2009. Nealkoholické a alkoholické nápoje. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Zlín. 129. ISBN: 978-80-7318-748-4
- [35] Rosi, I., Nannelli, F., Giovani, G. 2009. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation of wines obtained using different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. LWT – Food Science and Technology. 42 (2). 525-530.
- [36] Steidl, R. 2002. Sklepní hospodářství. Národní salon vín. Praha. 307. ISBN: 8090320104
- [37] Štefecná, K., Čepička, J. 2001. Průběh změn hlavních organických kyselin v průběhu vinifikace. Kvasný průmysl. 47 (9). 246-249.
- [38] Štulík, K. 2004. Analytické separační metody. Karolinum. Praha. 264. ISBN: 8024608529
- [39] Vahl, K., Kahlet, H., Von Mühlen, L., Meyer, G., Albert, A., Behnert, J. 2013. Determination of the titratable acidity and the pH of wine based on potentiometric flow injection analysis. Talanta. 2013 (4). 134-139.

## Přílohy

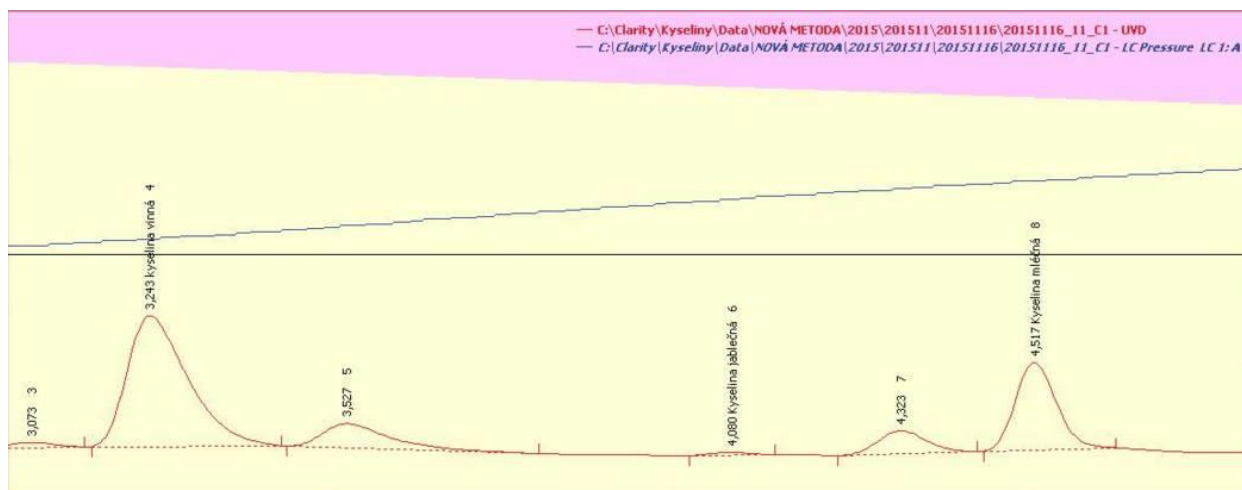
Tab. 1. Měření bílých vín

Datum měření	Odrůda	Vinná kyselina (g/l)	Jablečná kyselina (g/l)	Mléčná kyselina (g/l)
22. 10. 2015	Chardonnay	2,93	3,64	0,28
23. 10. 2015	Müller Thurgau	2,07	0,46	2,71
26. 10. 2015	Sauvignon	3,26	3,28	0,30
26. 10. 2015	Rulandské bílé	3,83	3,92	0,33
23. 10. 2015	Veltlínské zelené	2,09	1,47	1,57

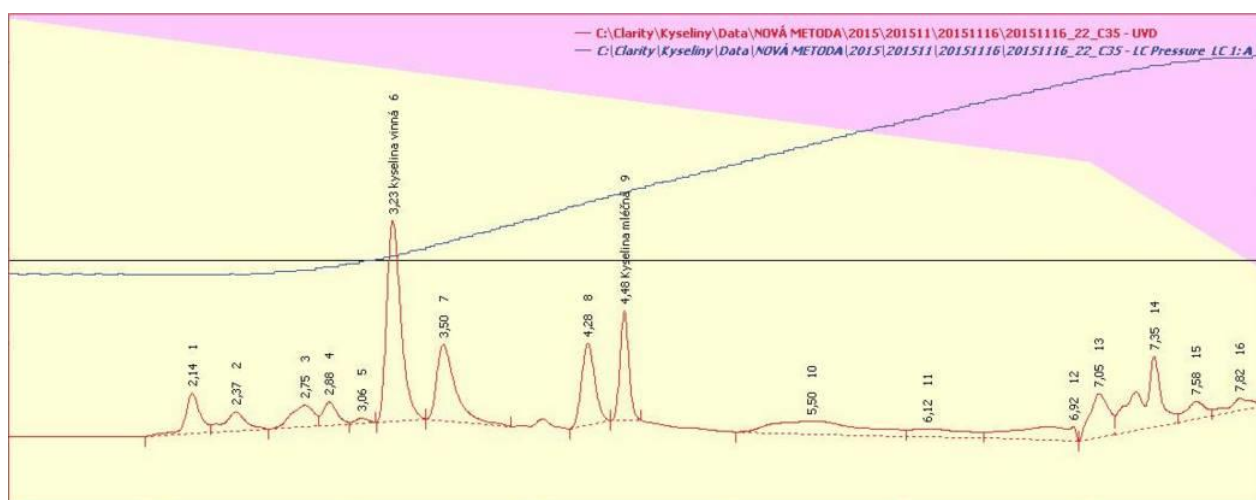
Tab. 2. Měření červených vín

Datum měření	Odrůda	Vinná kyselina (g/l)	Jablečná kyselina (g/l)	Mléčná kyselina (g/l)
16. 11. 2015	Frankovka modrá	3,21	0,08	1,71
15. 11. 2015	Modrý Portugal	3,38	0,03	2,22
8. 12. 2015	Rulandské modré	3,66	0	1,57
8. 12. 2015	Svatovavřínecké	3,37	0	2,22
7. 12. 2015	Zweigeltrebe	2,41	0,27	2,52

Obr. 3. Po vykvašení, s minimálním množstvím jablečné kyseliny



Obr. 4. Po vykvašení, úplné odbourání jablečné kyseliny



Obr. 5. Před druhotným kvašením – zakvašení bakteriemi

