

Vliv malolaktické fermentace na aromatický profil červeného vína

Diplomová práce

**Vedoucí práce
Ing. Michal Kumšta**

**Vypracoval
Bc. Radek Veselý**

Lednice 2015



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatel : **Bc. Radek Veselý**
Studijní program: Zahradnické inženýrství
Obor: Řízení zahradnických technologií
Název tématu: **Vliv malolaktické fermentace na aromatický profil červeného vína.**
Rozsah práce: 60 stran textu, tabulek, grafů a schémat

Zásady pro vypracování:

1. Prostudujte literaturu týkající se volatilních látek, které jsou vytvářeny během malolaktické fermentace. Uveďte hlavní zástupce těchto látek a popište jejich vliv na aromatický profil červeného vína. Jak se bude lišit obsah a další přeměna vedlejších produktů malolaktické fermentace v přítomnosti, nebo nepřítomnosti kasničních kalů.
2. Připravte červená vína ze tří odrůd s různými způsoby provedení malolaktické fermentace.
3. Připravené vína sensoricky zhodnoťte a proveďte základní chemickou analýzu i rozbor volatilních látek. Získané výsledky statisticky vyhodnoťte.

Seznam odborné literatury:

1. BRANCO, J M. – RIBÉREAU-GAYON, P. Handbook of enology. : The chemistry of wine stabilization and treatments. volume 2. Chichester, West Sussex, England. 2006. ISBN 97804700103962, 97804700103722. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/0470010398>.
2. RIBÉREAU-GAYON, P. – BRANCO, J M. Handbook of enology. : The microbiology of wine and vinifications. volume 1. Chichester, West Sussex, England. 2006. ISBN 97804700103651, 97804700103411. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/0470010363>.
3. POLO, C M. – MORENO-ARRIBAS, V M. *Wine chemistry and biochemistry*. 1. vyd. New York: Springer, 2008. 735 s. ISBN 978-0-387-74116-1.

Datum zadání diplomové práce: listopad 2013

Termín odevzdání diplomové práce: květen 2015

L. S.

Bc. Raděk Veselý
Autor práce

Ing. Michal Kumšta
Vedoucí práce

Ing. Mojmír Baroň, Ph.D.
Vedoucí ústavu



doc. Ing. Robert Pokluda, Ph.D.
Děkan ZF MENDELU

Poděkování

Rád bych poděkoval panu Ing. Michalu Kumštovi za vedení a odbornou spolupráci v průběhu vypracování této diplomové práce.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci: **Vliv malolaktické fermentace na aromatický profil červeného vína** vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 Autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity o tom, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Lednici dne 5. května 2015

Obsah

Seznam obrázků	9
Seznam grafů	10
Seznam tabulek	11
Seznam zkratk	12
1 Úvod	13
2 Cíl práce	15
3 Jablečno-mléčná fermentace	16
3.1 Defínování malolaktické fermentace	17
3.2 Biochemie malolaktické fermentace	20
3.3 Fyzikálně-chemické faktory ovlivňující MLF	20
3.3.1 Hladina oxidu siřičitého	20
3.3.2 Obsah alkoholu ve víně	21
3.3.3 Optimální teplota pro růst mléčných bakterií.....	21
3.3.4 Hodnota pH	21
3.3.5 Množství kyslíku	22
3.3.6 Výživa pro mléčné bakterie	22
3.3.7 Ostatní faktory ovlivňující MLF	22
3.4 Řízená malolaktická fermentace.....	23
3.5 Spontánní malolaktická fermentace.....	24
3.6 Bakterie jablečno-mléčné fermentace	24
3.6.1 Heterofermentativní mléčné bakterie	25
3.6.2 Homofermentativní mléčné bakterie	26
3.7 Nemoci vína vzniklé při malolaktické fermentaci.....	26
3.7.1 Octovatění	27
3.7.2 Manit a akrolein	28
3.7.3 Vláčkovatění	28

3.7.4	Zvrhnutí vína	29
3.7.5	Myšina ve víně	29
4	Vliv volatilních látek na aromatický profil červeného vína	30
4.1	Aromatické látky v červeném víně	30
4.2	Acetoinové sloučeniny	32
4.3	Aldehydy	34
4.4	Estery	35
4.5	Glykosidy.....	37
4.6	Sírné sloučeniny	37
4.7	Dusíkaté sloučeniny.....	40
4.8	Těkavé fenoly	41
4.9	Kyselina octová	42
4.10	Těkavé mastné kyseliny.....	42
4.11	Vyšší alkoholy	43
5	Materiál a metodika.....	44
5.1	Popis stanoviště odběru vzorků	44
5.2	Meteorologické zhodnocení roku 2014	44
5.2.1	Teplotní poměry	44
5.2.2	Srážkové poměry.....	45
5.3	Použitý materiál	46
5.3.1	André (An)	46
5.3.2	Cabernet Moravia (CM).....	46
5.3.3	Frankovka (Fr)	47
5.4	Příprava vzorků.....	47
5.5	Použité bakterie	48
5.5.1	BioStart Vitale SK11.....	48
5.5.2	BioStart Forte SK2.....	49
5.6	Pokusné varianty MLF	49
5.7	Metody měření.....	49
5.7.1	Stanovení cukernatosti moštu refraktometricky.....	50
5.7.2	Stanovení pH.....	50

5.7.3	Stanovení těkavých kyselin (EEC No 2676/90).....	51
5.7.4	Stanovení těkavých kyselin ve vzorku vína:	51
5.7.5	Stanovení kyseliny jablečné enzymaticky UV – metodou.....	51
5.7.6	Stanovení kyseliny mléčné.....	52
5.7.7	Stanovení kyseliny vinné podle Rebeleina	52
5.8	Stanovení volatilních látek ve víně.....	53
5.9	Plynová chromatografie.....	54
5.10	GC-MS stanovení jednotlivých volatilních sloučenin.....	54
5.10.1	Příprava vzorku	55
5.10.2	Chemikálie	55
5.11	GC-MS Analýza	56
6	Výsledky práce	58
6.1	Chemická analýza.....	58
6.2	Rozbor vína po MLF	59
6.3	GC-MS analýza	59
6.4	Senzorické hodnocení.....	68
6.4.1	Senzorické hodnocení vín podle úseček	69
6.4.2	Shrnutí sensorické analýzy	72
6.5	Statistická analýza	73
6.5.1	Shluková analýza	73
7	Diskuse	76
8	Závěr	80
9	Souhrn.....	82
10	Resume.....	83
11	Literatura	84

Seznam obrázků

Obr. 1	Množství buněk mléčných bakterií v různých stádiích výroby vína a při skladování	17
Obr. 2	Mléčné bakterie <i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>	18
Obr. 3	Konverze kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou	19
Obr. 4	Mechanismus přeměny L-jablečné kyseliny malát-laktátovým enzymem.....	20
Obr. 5	Souhrn bakteriálních cest způsobujících narušení aroma a chuti vína	27
Obr. 6	Zjednodušené schematické znázornění biosyntézy a přeměny aromatických sloučenin mléčnými bakteriemi	32
Obr. 7	Metabolismu kyseliny citronové a diacetylu	33
Obr. 8	Produkce čtyř hlavních těkavých sírných sloučenin tvořených metabolismem mléčných bakterií	38
Obr. 9	Znázornění vzniku silné a nepříjemných pachutí dusíkatých sloučenin 2-acetyltetrahydropyridinu (ACTPY) a 2-acetyl-1-pyrrolin (ACPY) některými mléčnými bakteriemi	41
Obr. 10	Dendogram chemické analýzy.....	74
Obr. 11	Dendogram sensorického hodnocení.....	75

Seznam grafů

Graf 1	Grafické znázornění obsahu vyšších alkoholů ve víně.....	61
Graf 2	Grafické znázornění obsahu těkavých mastných kyselin ve víně.....	62
Graf 3	Grafické znázornění obsahu těkavých fenolů ve víně	62
Graf 4	Grafické znázornění obsahu esterů ve víně	64
Graf 5	Grafické znázornění obsahu sirných sloučenin ve víně.....	65
Graf 6	Grafické znázornění obsahu esterů ve víně	66
Graf 7	Grafické znázornění obsahu sirných sloučenin ve víně.....	67
Graf 8	Grafické znázornění obsahu acetoinových sloučenin ve víně	67
Graf 9	Senzorický profil vzorků odrůdy „André“	70
Graf 10	Senzorický profil vzorků odrůdy „Frankovka“	71
Graf 11	Senzorický profil vzorků odrůdy „Cabernet Moravia“	72

Seznam tabulek

Tab. 1	Vzor aromatických látek vznikajících při malolaktické fermentaci	31
Tab. 2	Koncentrace a aroma aldehydů v červeném víně	35
Tab. 3	Vybrané estery v červeném víně.....	36
Tab. 4	Těkavé sírné sloučeniny v červeném víně	40
Tab. 5	Těkavé mastné kyseliny přítomné ve víně.....	43
Tab. 6	Vyšší alkoholy vyráběné bakteriemi při malolaktické fermentaci	43
Tab. 7	Standardy pro GC-MS analýzu.....	56
Tab. 8	Rozbor moštu.....	58
Tab. 9	Rozbor vína po MLF.....	59
Tab. 10	Výsledky GC – MS analýzy vybraných volatilních látek vyšších alkoholů, těkavých mastných kyselin a těkavých fenolů.....	60
Tab. 11	Výsledky GC – MS analýzy vybraných volatilních látek esterů, sírných sloučenin a acetoinových sloučenin.....	63
Tab. 12	Výsledky sensorického hodnocení 100 bodovým systémem	68
Tab. 13	Průměrné sensorické hodnocení vín dle úseček	69

Seznam zkratek

ACPY - 2-acetyl-1-pyrrolin

ACTPY - 2-acetyltetrahydropyridin

AF - alkoholová fermentace

An - André

AVSK - aktivní suché vinné kvasinky

CM - Cabernet Morávia

CO₂ - oxid uhličitý

DMS - dimethyl-disulfid

ETPY - 2-ethyltetrahydropyridin

Fr - Frankovka

KMBA - 2-oxo-4-(methylthiol) propionová kyselina

MB - mléčné bakterie

MLF - malolaktická fermentace

MTL - methanethiol

Leuc. - *Leuconostoc*

O. oeni - *Oenococcus oeni*

SO₂ - oxid siřičitý

1 Úvod

Víno je fenoménem současné doby. Řadí se mezi nejoblíbenější nápoje na světě a jeho spotřeba neustále roste. Na Moravu se réva vinná dostala údolím Dunaje, v době budování limes Romanus. Některé prameny uvádí, že již před Římany pěstovali révu na našem území Keltové. Největšího rozmach v Čechách doznalo vinohradnictví za panování Karla IV. Od té doby prošlo vinohradnictví a vinařství velkými změnami. Za poslední roky došlo k modernizaci technologií a výsadbě velkých ploch vinic.

Práce s vínem není pro mnoho lidí jenom úmorná celoroční práce ve vinici a následně ve sklepě, ale stalo se jím koníčkem a posláním. Dostatek znalostí a přístup k informacím umožňuje vinařům neustále zvyšovat kvalitu a uspokojovat potřeby náročných konzumentů. Stále více lidí spojuje víno s gastronomií. Snoubení pokrmů s vínem se stalo jednou z oblíbených možností, jak se oprostit od každodenních starostí a na chvíli relaxovat.

Vliv vína na zdraví člověka je v současné době velmi diskutovaným tématem. Zdravotní strážce při konzumaci vína se věnuje stále větší pozornost vzhledem k prevenci a léčbě některých civilizačních chorob. Velký vliv je přisuzován zejména velmi rozšířeným srdečním a cévním onemocněním. Červené víno díky vyššímu obsahu tříslovin působí kladně také na funkci imunitního systému a chrání tělo před infekčními onemocněními. Víno má pozitivní vliv na lidský organismus jen při jeho pravidelné a střídme konzumaci.

Smyslové vnímání aromatických látek vína je výsledkem složité interakce s lidským čichovým systémem. Pro lepší pochopení preferencí spotřebitelů ve vztahu k senzorickým vlastnostem je třeba porozumět vlivu možných faktorů ovlivňujících aroma a chuť vína. Největší podíl aromatických látek je tvořeno kvasinkami při alkoholové fermentaci, ale také při malolaktické fermentaci vytváří mléčné bakterie široké spektrum, jak pozitivních, tak negativních vůní.

Vliv malolaktické fermentace na aromatický profil vína nelze nijak normovat ani uniformovat a u každého vína se projevuje rozdílnou intenzitou. Obecně jí je přisuzováno nepatrné snížení odrůdového a ovocného aroma s nástupem mléčných nebo máselných vůní, které jsou připisovány diacetylu. Po určitém čase se vlivem

enzymatických procesů autolýzy kvasinek jeho koncentrace snižuje a je mu přisuzována vůně karamelu, čerstvého chleba nebo lískových oříšků.

V dnešní době je na trhu široké spektrum mléčných bakterií od různých výrobců, kterými lze riziko vzniku mnohých nežádoucích produktů snížit nebo úplně eliminovat. Změna aroma vína v důsledku malolaktické fermentace podléhá velkému množství rozličných faktorů, které nelze v praxi zcela ovlivnit.

2 Cíl práce

Úkolem diplomové práce bylo prostudovat literaturu týkající se volatilních látek, které jsou vytvářeny během malolaktické fermentace. Byly zde uvedeny hlavní zástupci těchto látek a popsán jejich vliv na aromatický profil červeného vína. Dalším úkolem bylo objasnit přeměnu těchto vedlejších produktů v přítomnosti nebo nepřítomnosti kvasničných kalů.

K experimentální části byly vybrány tři modré moštové odrůdy André, Frankovka a Cabernet Moravia. Ze všech odrůd bylo vyrobeno víno a byly provedeny tři různé typy malolaktické fermentace. Jeden vzorek z každé odrůdy byl ponechán bez malolaktické fermentace.

Cílem bylo senzoričné hodnocení připravených vín a provedení základní chemické analýzy. Dále měl být udělán rozbor volatilních látek a v poslední řadě získané výsledky statisticky zhodnotit.

3 Jablečno-mléčná fermentace

Procesy probíhajícími ve víně se zabýval pře více jak 150 lety francouzský biolog, chemik a lékař Luis Pasteur. Již v roce 1857 zjistil, že bakterie jsou zapojeny do procesů při výrobě vína a dovedou přeměnit sacharidy na kyselinu mléčnou a proces pojmenoval *kvašení kyseliny mléčné*. Koncem 19. Století dokázal, že bakterie se podílí na různých nemocech vína a také se všiml, že zdravé víno ztratí kyselost při skladování a přičítal tento jev bakteriím.

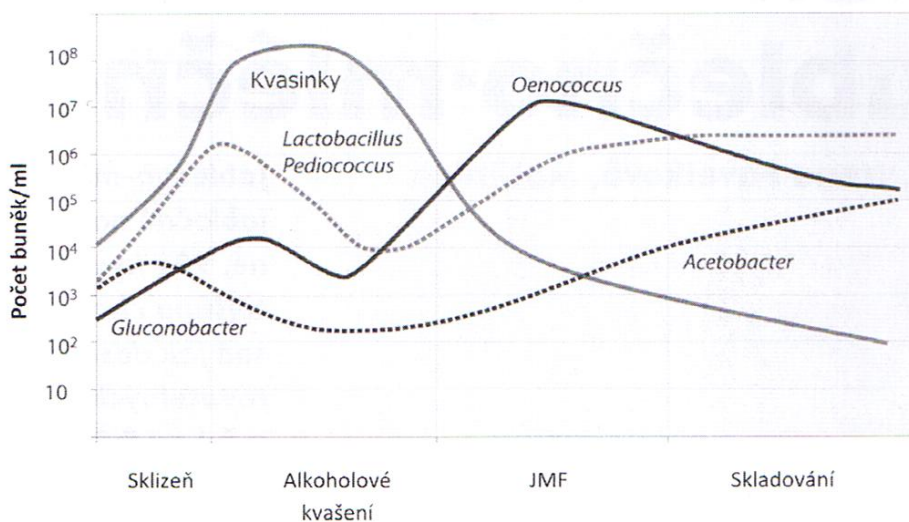
Někteří další vědci přičítali tuto skutečnost kvasinkám, až v roce 1897 Alfred Koch poprvé izoloval z média bakterie, které mohou měnit kyseliny. Všiml si, že pokles kyselosti může mít spojitost se ztrátou kyseliny jablečné. Přidáním kyseliny salicylové (inhibuje růst bakterií) do vína dokázal, že kvasinky nemohou být zodpovědné za ztrátu kyselosti. Tuto skutečnost silně podpořil Müller-Thurgau, který učinil první pokusy řízení MLF.

Chvilí poté vědec Leonard Seifert z Klosterneuburgu také izoloval mléčné bakterie a určil jejich podobu jako párové koky. Pojmenoval je *Micrococcus malolacticus* a dokázal konverzi kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou. V roce 1901 Möslinger představil sumární vzorec a děj chemicky definoval: *kyselina jablečná se odbourává na kyselinu mléčnou a oxid uhličitý*.

Během dalšího desetiletí byly izolovány další čtyři kmeny mléčných bakterií z MLF a v roce 1913 prezentovali Müller-Thurgau a Osterwalder vědeckou práci „*Bakterie ve víně a ovocných nápojích způsobují změny*“. Publikace představuje podrobný taxonomický popis všech bakterií, které byly izolovány z vína. Udává, že kyselinajablečná je nejrozšířenější organickou kyselinou v ovoci a kyselina vinná je typická pro hrozny. Tato práce se dále zabývala mléčnými tóny, diacetylem, kyselinou octovou, vláčkovatěním, glycerolem, manitovými tóny a odbouráváním kyseliny jablečné. Tématikou biologického odbourávání kyselin se od 60. let 20. století zabývalo množství vědeckých publikací. (HORNSEY, 2007)

3.1 Definování malolaktické fermentace

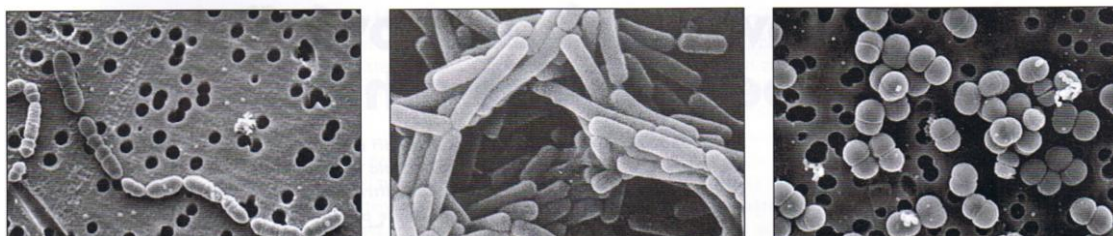
Malolaktická fermentace je definovaná, jako biochemický proces, při kterém dochází ke změně L-jablečné kyseliny na L-mléčnou kyselinu a oxid uhličitý. Množství buněk mléčných bakterií (MB) v různých stádiích výroby a při skladování zobrazuje obrázek 1. Její význam spočívá ve zvýšení pH a snížení kyselosti, protože kyselina jablečná má velmi ostrou chuť, a proto je dikarboxylová kyselina jablečná v průběhu MLF přeměněna na monokarboxylovou kyselinu mléčnou. V moderní technologii se MLF využívá hlavně při výrobě červených vín. I když snížení kyselosti patří k nejdůležitějším důvodům, stále více vinařů tuto metodu upřednostňuje ke zvýraznění vůně a chuti vína. (MENDELU, 2013)



Obr. 1 Množství buněk mléčných bakterií v různých stádiích výroby vína a při skladování
Zdroj: (PAVELKOVÁ, 2007)

Malolaktická fermentace se zabývá přeměnou malátu na laktát a ta produkuje energii ve formě ATP. Malát je anion dikarboxylové kyseliny, jež má dvě kyselé karboxylové skupiny COO-H^+ , kdežto laktát obsahuje jen jednu karboxylovou skupinu COO-H^+ . Transformací malátu na laktát dochází ke snížení kyselosti a vzniku jedné molekuly CO_2 . Průběh MLF si žádá přiměřené množství NAD^+ a Mn^{2+} . Velmi významné je vzájemné působení mléčných bakterií a kvasinek. Některé kmeny bakterií jsou velmi citlivé na přítomnost kvasinek, a proto je nezbytné s inokulací počkat až do konce AF. Druhy MB jsou zobrazeny na obrázku 2. Jedním z hlavních činitelů

zdárné realizace MLF je vhodné načasování inokulace MB. Velmi často dochází k přeměně velkého množství kyseliny citrónové a tím vzniku nežádoucích sekundárních metabolitů. (BAROŇ, 2011)



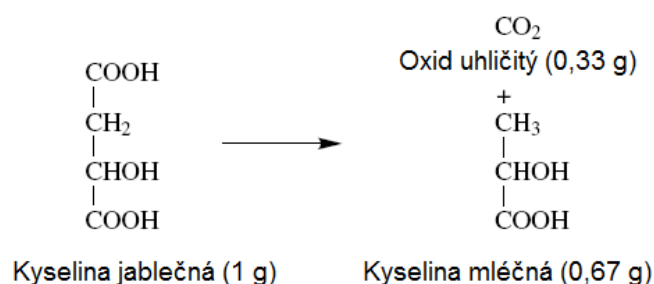
Obr. 2 Mléčné bakterie *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*
Zdroj: (FURDÍKOVÁ, MALÍK, 2009)

Po spotřebě glukózy dávají MB přednost kyselině jablečné, ke které mají poměrně vysokou afinitu. Počet iontů vodíku nacházející se v kyselině jablečné, se sníží na polovinu a hodnota pH se zvýší o několik desetín. Produkce CO₂ má za následek malý úbytek extraktu. Velmi užitečnou změnou chemického složení vína je omezení či zmenšení vazebných partnerů SO₂ při MLF. Dehydrogenázy (enzymy) mléčných bakterií redukuje kyselinu pyrohroznovou na kyselinu mléčnou a acetaldehyd na etanol. Snižuje se také množství pyruvátu a kyseliny ketoglutarové. Tím sníží požadavek kyseliny siřičité o 10-15 mg/l. (EDER ET AL., 2006)

Vedle transformace kyseliny jablečné se mění také další zdroje vodíku, například kyselina citronová, polyalkoholy, fruktóza, kyselina glukonová, glycerin a kyselina pyrohroznová. Zároveň se vytváří malé množství acetoinu, vyšších alkoholů a kyseliny octové. Kromě různých produktů látkové výměny se z organicky vázaného dusíku tvoří amoniak (NH₃). V závislosti na bakteriálním kmeni se mohou aminokyseliny přeměnit na 24 různých biogenních aminů, které se podílejí na různorodosti výsledků látkové výměny. Tento děj nastává jen po infekci nežádoucími bakteriemi a vzniklé substance se mohou jevit jako vadné nebo zatuchlé aromaty. (MENDELU, 2013)

Při MLF se z 1 g kyseliny jablečné vyrobí maximálně 0,672 g kyseliny mléčné. Konverze kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou znázorňuje obrázek 3. Kontrolou množství kyseliny mléčné a jablečné před a po MLF se lze ujistit, zda tato reakce proběhla správně. Množství kyseliny mléčné při správně provedené degradaci kyselin,

je nejvyšš 1,5-3,5 g/l. Obsah titrovatelných kyselin se sníží 0,01 až 0,03 g/l v důsledku fixace vodíkových iontů a hodnota pH vzroste o 0,1 až 0,3 jednotek. Výsledkem je bakteriální stabilita, která je daná prostředím, ve kterém se nevyvíjí žádné jiné škodlivé organismy, protože MB spotřebovaly pro svou činnost všechny živiny. Dalším příčinou může být tvorba bakteriálních toxinů, které usmrcují ostatní bakterie. (FURDÍKOVÁ, MALÍK, 2009; PAVELKOVÁ, 2007)



Obr. 3 Konverze kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou

Zdroj: (RIBÂEREAU-GAYON ET AL., 2006)

Malolaktická fermentace se může konat spontánně za podpory přirozené mikroflóry, stejně jako alkoholová fermentace. Rizika spojená se spontánní MLF jsou podobná, jako při spontánní AF. Bakterie obdobně jako kvasinky, působí na víno více způsobů. Největším problémem může být opožděná nebo zastavená fermentace nebo vytvoření sekundárních, sensoricky aktivních látek. Mošty v našich podmínkách vykazují vyšší celkovou kyselost a příliš mnoho kyseliny jablečné, hlavně v teplotně horších ročnících, a proto se MLF jeví velmi pozitivně. (MINÁRIK ET AL., 1970)

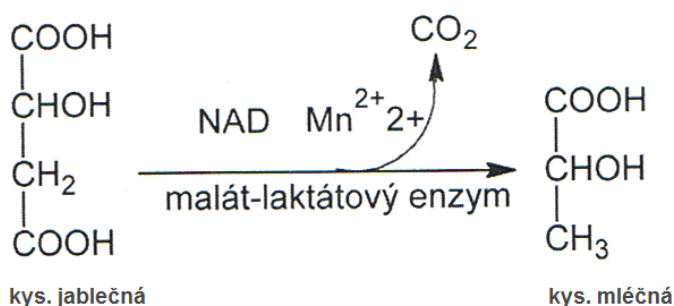
Velký význam pro MLF má alkoholová fermentace. Mošt je velmi bohatý na laktobakterie a fermentací kvasinkami se mění na nepříznivé prostředí pro bakterie. Vysoký obsah alkoholu je pro ně toxický, vyčerpání živin kvasinkami, SO₂ nebo nízká hodnota pH. Jen některé kmeny jsou schopny po AF růst v takovém prostředí. Zdrojem energie je pro růst MB kyselina jablečná a citrónová. Jakmile je tento zdroj energie vyčerpán, tak bakterie odumírají a nemohou dále růst. Velmi významné je sledovat obsah kyseliny mléčné, protože v množství do 5 g/l se jeví příznivě, působí jemným a kulatým dojmem. Kdežto ve vyšších koncentracích je sensoricky nepřijatelná. U vín je důležité, aby proběhlo odbourání kyseliny jablečné na hodnotu kolem nuly nebo nulu. Pokud ve víně zůstane, je nebezpečí, že bakterie obnoví za nějakou dobu svoji činnost

a u nalahvovaných vín se vytvoří jemné perlení CO₂ nebo prachový zákal. Degradace kyseliny jablečné není vhodná u vín s vyšším obsahem zbytkového cukru. Maximální hranice je do 20 g/l, protože zde hrozí nebezpečí, že bakterie nebudou spotřebovávat kyselinu jablečnou, ale cukr a dojde k tvorbě kyseliny octové. (Kyseláková, 2003)

3.2 Biochemie malolaktické fermentace

Kyselina L-jablečná se může na kyselinu mléčnou a oxid uhličitý transformovat třemi metabolickými dráhami. Prvním mechanismem je odbourání L-jablečné kyseliny maláthydrogenásou. Druhým je odbourání L-jablečné kyseliny malátovým enzymem. Nejdůležitější je pro MLF třetí mechanismus, kterým je odbourání L-jablečné kyseliny malát-laktátovým enzymem.

Přímou transformaci L-malátu na L-laktát při MLF umožňuje homofermentativním bakteriím malát-laktátový enzym. Mechanismus přeměny L-jablečné kyseliny malát-laktátovým enzymem ukazuje obrázek 4. Pro odbourávání kyseliny jablečné je tento enzym nejvýznamnější. (Havran, Stratil, 2008)



Obr. 4 Mechanismus přeměny L-jablečné kyseliny malát-laktátovým enzymem
Zdroj: (Havran, Stratil, 2008)

3.3 Fyzikálně-chemické faktory ovlivňující MLF

Pro zdárný vývoj MLF a kvalitu vína je zapotřebí dodržet určité podmínky. Tyto podmínky jsou analyzovány v následujícím textu.

3.3.1 Hladina oxidu siřičitého

Pro úspěšný průběh MLF je podstatný obsah volného a veškerého oxidu siřičitého ve víně. Pokud je možnost volný nejlépe žádný nebo maximálně do 20 mg/l. Na toxicitu

volného SO₂ má významný vliv pH, protože čím je víno kyselější, tím je vyšší jeho antiseptická schopnost a účinnost. Množství celkového SO₂ je hodně kritické, protože bakterie nezvládají hodnoty vyšší než 50 mg/l.

Bakterie jsou vesměs velmi citlivé na SO₂ daleko více než kvasinky. Je nutné si uvědomit vazbu volného SO₂ na pH a tvorbu SO₂ kvasinkami. Nejcitlivějšími bakteriemi jsou *O. oeni* u kterých i malé množství vyprodukované kvasinkami může způsobit inhibici. MB více než jeho vázaná podoba inhibuje volný SO₂, protože má větší antimikrobiální aktivitu. Už při zpracování hroznů je nutné mít na paměti nízkou úroveň SO₂ vzhledem k plánované MLF. Pokud se během vinifikace použijí zdravé hrozny a čisté kultury kvasinek může se od sifení zcela upustit.

3.3.2 Obsah alkoholu ve víně

Je nutné zmínit, že vysoký obsah alkoholu zpomaluje růst a životaschopnost MB. Je známo, že jeho obsah by neměl překročit 14 %. Nad touto hranicí, stejně jako kvasinky, ztrácí svoji aktivitu a jsou inhibovány.

Nalezneme ovšem bakterie, jež jsou schopné odbourávat do 16 % alkoholu. Některé selektované kmeny *O. oeni* jsou vůči alkoholu velmi tolerantní.

3.3.3 Optimální teplota pro růst mléčných bakterií

Jedním z klíčových faktorů pro úspěšnou MLF je správná teplota. Optimální teplota pro MB je 20-37 °C.

Pokud je obsah alkoholu 13-14 %, optimální teplota pro růst MB je nižší. Vinaři ovšem obvykle využívají teplotu 18-22 °C. Při teplotě pod 15 °C jsou bakterie inhibovány a při vysokých teplotách dochází v podstatě k rychlejší konverzi, které se může zúčastnit mnoho nežádoucích kmenů bakterií a k produkci sekundárních sloučenin.

3.3.4 Hodnota pH

pH vína stanovuje, které MB se budou podílet na MLF, ovlivňuje rychlost jejich růstu a v případě, kdy vykazuje hodnoty nižší než 2,9 mají pro *O. oeni* inhibiční efekt. Nejvhodnější je pH 3,3-3,4. Tyto hodnoty pH poskytují podporu *O. oeni* a tlumí

nežádoucí MB. Mnozí se domnívají, že pokud má víno pH 3,5-3,8 a nízký obsah kyselin, není vhodné toto víno odbourávat. MLF může probíhat 10x rychleji a ve víně vznikají ideální podmínky pro růst divokých mléčných bakterií (*Pediococcus sp.* a *Lactobacillus sp.*). Jejich aktivita vede ke spotřebě cukrů a tvorbě polysacharidů, které mají za následek znehodnocení vína vláčkovatěním a kyselinou octovou.

Jestliže je hodnota pH hodně nízká a MLF by bylo těžké za těchto podmínek nastartovat, tak se dá víno odkyselit např. uhličitánem vápenatým.

3.3.5 Množství kyslíku

Malé množství kyslíku stimuluje během MLF růst populace mléčných bakterií a působí pozitivně na širokou škálu konečných produktů. To může být výhoda dřevěných sudů, které jsou schopné dávkovat kyslík v malém množství a rovnoměrně.

Naproti tomu velké kvantum kyslíku může podporovat rozvoj nežádoucích organismů a tím vznik kyseliny octové.

3.3.6 Výživa pro mléčné bakterie

Mléčné bakterie jsou náročné na velké množství růstových činitelů. Na rozdíl od kvasinek vyžadují přítomnost několika aminokyselin, které si neumí samy nasyntetizovat z amonných iontů. To ale není problém, protože při autolýze kvasinek po AF se do vína uvolňuje značné množství dusíkatých sloučenin a tedy také potřebných aminokyselin. To může být jedena z příčin, proč je činnost MB během AF potlačena.

3.3.7 Ostatní faktory ovlivňující MLF

Malolaktické fermentace se účastní další látky, které ji mohou ovlivnit. Růst mléčných bakterií stimulují **fenolické látky** prostřednictvím kyseliny galové a anthokyanů. **Organické kyseliny**, a to hlavně vyšší mastné kyseliny mohou způsobovat zpomalení MLF nebo inhibici MB.

Také přítomnost **jiných druhů mléčných bakterií** může způsobit problémy při odbourání kyseliny jablečné z důvodu zvýšené konkurence o živiny. Vedlejším

produktem MLF je **oxid uhličitý**, ten vykazuje stimulační efekt a ve víně vytváří anaerobní prostředí. (BAROŇ, 2011; PAVELKOVÁ, 2007)

3.4 Řízená malolaktická fermentace

Mezi mléčnými bakteriemi a kvasinkami se vyskytuje mnoho podobností. Postupně se zavádí čisté kultury MB a vhodných bakteriálních kmenů pro řízenou MLF je na trhu celá řada. Víno obsahuje velmi obtížné fyzikálně-chemické prostředí. Hlavně nízké pH, vyšší obsah alkoholu, přítomnost SO₂ a malé množství živin vytváří velmi stresující podmínky pro růst MB. Na trhu se dnes nabízí vyselektované kultury lyofilizovaných bakterií *O. oeni*, které si s těmito těžkými podmínkami umí poradit. Začínají se zkoušet také kmeny *Lactobacillus*, ale jejich nevýhodou je jejich striktní heterofermentativnost.

Načasování inokulace MB je velmi důležitý faktor. Mohou se očkovat současně s kvasinkami při zahajování alkoholové fermentace. Zde může dojít ke zvýšení obsahu kyseliny octové, poklesu životaschopnosti jak kvasinek, tak MB, a následně k převázení aktivity kvasinek. Dalším způsobem je inokulovat v závěrečné fázi AF. Velkou výhodou je dostatek živin pro MB, nízký obsah alkoholu a využití tepla AF. Nevýhodou může být zvýšený obsah SO₂, vytvořený kvasinkami a možnost předčasného ukončení alkoholové fermentace. Tento způsob je velmi riskantní. Další metodou je očkování po dokončení AF. Zde je nutné vyčerpání živin podpořit autolýzou kvasinek. Ve víně je velké množství alkoholu a jiných produktů kvasinek, které vytváří obtížné podmínky MLF. Při tomto způsobu se ale sníží riziko tvorby diacetylu a jiných vedlejších produktů.

Při zahajování MLF selektovanou kulturou MB se preventivně předchází rozvoji nežádoucích bakterií a tím nepříjemných metabolitů. Musí být kladen důraz na správnou volbu kmene. Ten by měl být kompatibilní s použitým kmenem kvasinek. Hlavně je nižší produkce těkavých kyselin, diacetylu a biogenních aminů. Vzhledem k vedlejším MLF je vhodné provádět odbourání kyseliny jablečné po AF. Při vytvoření optimálních podmínek pro degradaci kyseliny jablečné, proběhne MLF rychle a čistě zpravidla za 4-6 týdnů. (FURDÍKOVÁ, MALÍK, 2009; PAVELKOVÁ, 2007)

3.5 Spontánní malolaktická fermentace

Spontánní MLF se pokládá za metabolický proces probíhající samovolně po alkoholové fermentaci na přítomné mikroflóre vína. Při sběru hroznů se na slupkách bobulí hroznů nachází velké množství mikroorganismů, bakterií, kvasinek a hub, které mají negativní dopad na budoucí kvalitu vína.

Většina spontánních MB tvoří biogenní aminy, diacetyl, těkavé kyseliny a estery, které mohou způsobovat nežádoucí pavuňe a pachutě. Z „divokých“ MB *Lactobacillus sp.*, *Pediococcus sp.* a *Oenococcus sp.* lze jen posledně jmenované posuzovat kladně, a to jen když se prosadí v konkurenci s nežádoucími kmeny MB. Většinou je věcí náhody jestli MLF vykonají žádoucí nebo nežádoucí MB. Dlouhotrvající MLF má špatný vliv na aroma, protože se jí mohou zúčastnit i jiné druhy než *O. oeni*, *Lactobacillus plantarum* může rozkládat v červených vínech vinný kámen, glycerol a kyselinu vinnou na kyselinu mléčnou, kyselinu octovou a CO₂. Tento jev se nazývá zvrhnutí vína.

Při spontánní MLF vzniká mnoho poruch kvality vína. Jednou z nich je hořkost, kterou lze definovat jako rozklad glycerolu na akrolein. Nepříjemnou hořkost způsobuje kombinace akroleinu s taninem. Další může být mléčná pichlavost, která je způsobena nedokvašenými cukry. Ty jsou bakteriemi přetvářeny na kyselinu octovou, etanol a CO₂. Ve víně je přítomen D-isomer kyseliny mléčné na rozdíl od kyseliny L-mléčné produkovaná selektovanými *O. oeni*. Zkažení vína může způsobit ethylkarbamát, který je zdraví škodlivý. Tvoří se z argininu metabolismem divokých bakterií. (MINÁRIK, 2008)

3.6 Bakterie jablečno-mléčné fermentace

Výroba vína je komplexní mikrobiální proces, který zahrnuje kvasinky a bakterie. MB se nenachází ve víně ani v moštu, ale vyskytují se ve slupkách dozrávajících bobulí hroznů. Do moštu se dostávají drcením a lisováním. Je pravděpodobné, že bakteriální flóry se nachází na druhotných místech provozoven, tj. tanky, sudy, potrubí, hadice, nářadí, podlaha atd. V přírodě byly nalezeny na listech révy a v půdě. Množství a výskyt MB v kvasících moštech jsou vcelku nepravidelné. Z tohoto důvodu nebývá

ani MLF v různých ročnících stejně intenzivní. I když nejsou podmínky na bobulích a v nekvasících moštech ideální, malá část bakteriálních buněk je schopná toto nepříznivé období přečkat a dokonce se může slabě rozmnožovat.

Mléčné bakterie jsou charakteristické společnými fyziologickými a strukturálními vlastnostmi. Jsou nepohyblivé, grampozitivní a asporogenní. Všechny bakterie, se kterými se ve víně stětáváme můžeme považovat za heterotrofní mikroorganismy, které jako energetický a stavební zdroj využívají už vytvořenou organickou hmotu, hlavně cukry, organické kyseliny, organické sloučeniny dusíku apod. (MENDELU, 2013)

Mléčné bakterie se dělí podle typu organismu na heterofermentativní a homofermentativní. Obě kategorie jsou schopné degradovat kyselinu jablečnou, ale odlišnost nastává v metabolismu sacharidů. Heterofermentativní bakterie produkují z hexózy etanol, kyselinu mléčnou a CO₂, ale homofermentativní se omezují na jediný produkt a tím je kyselina mléčná. Paradoxem je, že i při vysokých koncentracích cukrů v moštu, nevzniká kyselina mléčná ze sacharidů. Kyselina mléčná je ve víně výsledkem MLF, i když jsou cukry pro růst bakterií potřebné. Afinita bakterií k sacharidům je mnohem nižší než k lehce odbouratelné kyselině jablečné. Bakterie degradující kyselinu vinnou se ve víně moc nevyskytují. (FURDÍKOVÁ, MALÍK, 2009)

3.6.1 Heterofermentativní mléčné bakterie

Heterofermentativní MB produkují přeměnou glukózy výrazně větší koncentraci kyseliny octové a dalších meziproduktů (např. acetaldehyd, etanol apod.). V enologii k dobře známým druhům patří hlavně druh *Oenococcus oeni*, který se pro jeho dobré fyziologické vlastnosti používá pro MLF. Je to Gram-pozitivní kmen bakterií, který má kokovitý tvar a obsahuje silnější polysacharidovou buněčnou stěnu, kyselinu lipoteikoovou, kyselinu teinovou, obsahuje menší množství lipidů a větší koncentraci polysacharidů. *Oenococcus oeni* vytváří ze sacharidů více kyseliny octové, ale při překvašení cukrů produkuje výrazně méně sekundárních metabolitů, které negativně ovlivňují kvalitu vína, např. diacetylu. Je více odolný vůči vysokému alkoholu, ale tento kmen bakterií je více citlivý na SO₂.

Heterofermentativní bakterie mají kulatý tvar a tvoří diplokoky. Jsou důležité při transformaci L-jablečné kyseliny a vůči kyselosti jsou více odolné než bacily. Bakterie se za příznivých podmínek mohou dělit poměrně rychle a už za 15 až 20 minut. Buňky se dělí příčným dělením.

3.6.2 Homofermentativní mléčné bakterie

K homofermentativním MB patří tyčinkovité (např. *Lactobacillus*) a kulovité bakterie (koky, např. *Pediococcus damnosus*). Některé kmeny druhu *Lactobacillus* a *Pediococcus damnosus* vytváří z hexoz L-kyselinu mléčnou a D-kyselinu mléčnou, ale také kyselinu octovou. Produkované množství se mění v závislosti na kmenu bakterií. Kyselina L-mléčná a D-mléčná kyselina se od sebe odlišuje svou optickou aktivitou, tzn., že sloučeniny mají centrum nesouměrnosti, např. asymetrický uhlík (chirální uhlík). Takové látky mohou mít i více chirálních center jako např. kyselina vinná. Tyto sloučeniny se objevují ve dvou formách a mají způsoblost otáčet rovinu polarizovaného světla. U kyseliny mléčné je chirální centrum umístěné na druhém uhlíku, tzn., že hydroxylová skupina otočená vpravo se nazývá kyselina D-mléčná, a jestli je hydroxylová skupina otočená vlevo, tak se nazývá kyselina L-mléčná.

Mikrobiálně zkažené víno je při koncentraci více než 1 g/l. Velké množství diacetylu produkují *Pediococcus damnosus* a při množství více jak 5 mg/l se projevuje velmi negativně. (HAVRAN, STRATIL, 2008)

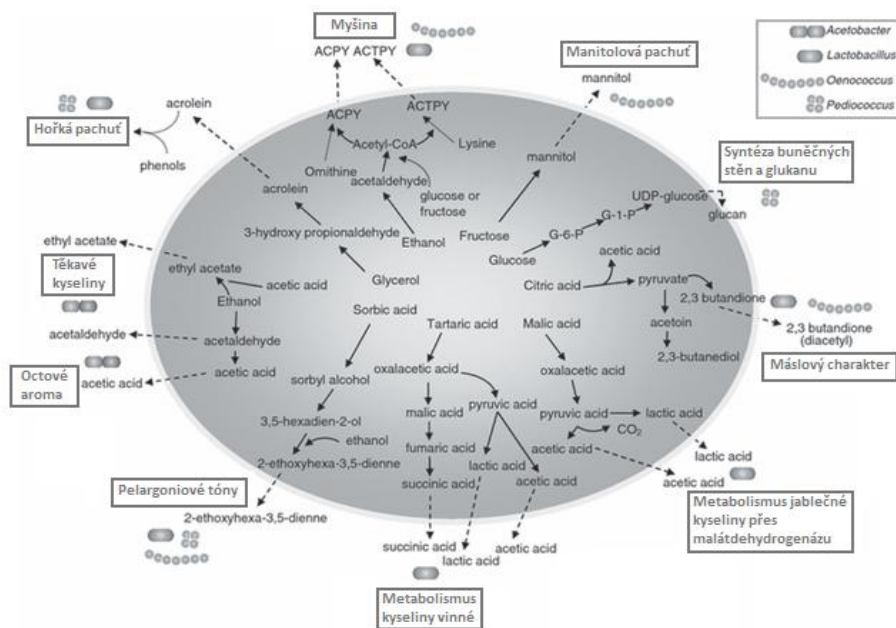
3.7 Nemoci vína vzniklé při malolaktické fermentaci

V průběhu výroby a zrání probíhají ve víně různé biochemické a fyzikálně chemické procesy, které ovlivňují kvalitu výsledného produktu. Při dodržení všech správných technologických postupů je předpoklad, že vína budou kvalitní a zdravá. Za nepříznivých podmínek, které mohou nastat použitím nevhodných nádob, zpracováním nahnilých hroznů za vyšších teplot může dojít k rozvoji škodlivých mikroorganismů.

Nemoci vína vytváří hlavně mikroorganismy. Způsobují tvorbu produktů látkové výměny, jako jsou třeba diacetyl, kyselina octová ethylfenoly nebo manit. Snižuje se také obsah původních látek, jako třeba kyselina vinná, kyselina citrónová nebo glycerin.

Postižená vína mají špatné fyzikální vlastnosti a na pohled vypadají neatraktivně. Mikroorganismy, které víno ohrožují, jsou známy a předcházet se jim dá dobrou hygienou ve sklepním hospodářství a kvalitní péčí ve vinici. (ŠVEJCAR, 2006; EDER ET AL., 2006)

Na obrázku 5 je znázorněn souhrn bakteriálních cest vedoucích k narušení aroma a chuti vína.



Obr. 5 Souhrn bakteriálních cest způsobujících narušení aroma a chuti vína
Zdroj: (BARTOWSKY, 2008)

3.7.1 Octovatění

MB produkují za příznivých podmínek během MLF kyselinu octovou z glukózy, která může být přítomná po AF ve formě zbytkového cukru. Bakterie ho potřebují pro svou aktivitu 0,4-0,8 g/l a nanejvýš 3-4 g/l. Při větším množství by mohlo vzniknout velké množství kyseliny octové. Pokud MLF začne velmi brzy a cukry nejsou zcela prokvašeny, může dojít ke zkažení vína. MB transformují cukry na kyselinu D-mléčnou, kyselinu octovou, alkoholy a aldehydy. Ve zdravých vínech je množství těkavých kyselin 0,2-0,5 g/l.

Mezi těkavé kyseliny patří kromě kyseliny octové, kyselina valerianová, kyselina mravenčí, kyselina máslná, vyšší mastné kyseliny jako například kyselina propionová

a další. Ve víně se objevují zčásti ve formě volných kyselin a z části ve formě esterů s alkoholem. Nejvýznamnějším esterem kyseliny octové etylacetát (octan etylnatý). Jestli se ve víně nachází, společně s těkavými kyselinami jedná se o nemoc, tzv. naoctění. Projevuje se vedle nepříjemné vůně také protivným škrábáním v krku. (MENDELU, 2013)

3.7.2 Manit a akrolein

Heterofermentativní mléčné bakterie, zejména druhy *Lactobacillus* a *Pediococcus* produkují prostřednictvím metabolismu fruktózy mannitol. Jeho tvorba je většinou doprovázena produkcí kyseliny octové. Nejvíce jsou náchylná málo zasiřená vína s nízkým obsahem kyselin a alkoholu ve fázi školení. Mannitol, hořký a octový tón vyprodukovaný MB se nedá z vína odstranit.

Některé kmeny *Lactobacillů* jsou schopny odbourávat glycerin vyprodukovaný při AF. Mléčné bakterie rozkládají glycerin na 3-hydroxypropionaldehyd, který se spontánně rozkládá na akrolein. Při reakci akroleinu s fenoly dochází ke snížení barvy, k usazeninám, zákalům a k hořkým tónům ve víně. (EDER ET AL., 2006)

3.7.3 Vláčkovatění

Vláčkovatěním se označuje nemoc, která je ve své podstatě neškodná a dá se z vína bez větších problémů odstranit. Původ této nemoci je přičítán vínům, která byla málo sířena, s nízkým obsahem kyselin a alkoholu a větším zbytkovým cukrem.

Sliz produkují bakterie rodu *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum* a také *Pediococcus damnosus*. Bakterie jsou částečně teplomilné, anaerobní a vyhovuje jim prostředí při pH 5,5-6. Napadená vína se projevují vysokou viskozitou, zákalem a při nalévání se táhnou. Časem dochází ke ztrátě aroma a zvětralosti. Někdy se také může tvořit oxid uhličitý. K odstranění zvláčkovatění může přispět provzdušnění a zasiřování. Dojde k usazení slizových látek a vínu prospěje vyčeření želatinou a následné zfiltrování. (EDER ET AL., 2006)

3.7.4 Zvrhnutí vína

Tato nemoc se vyskytuje hlavně u červeného vína a jsou za ni zodpovědné MB *Lactobacillus plantarum*. Rozkládají kyselinu vinnou a vinný kámen na kyselinu octovou a CO₂. Bakterie jsou schopné rozkládat také glycerin, který se mění na kyselinu mléčnou a octovou, CO₂ a malé množství kyseliny propionové.

Předcházet zvrhnutí červených vín, které mají nízký obsah tříslovin a barvu je možné důsledným sířením už před fermentací. (MINÁRIK ET AL., 1970)

3.7.5 Myšina ve víně

Myšinou se projevují hlavně mladá vína s nižším obsahem kyselin, vysokým pH a zbytkovým cukrem, které leží delší dobu při vyšší teplotě na kvasničných kalech. Nemoc způsobují MB *Lactobacillus cellobiosus* a *Lactobacillus brevis* a v menší míře kvasinky *Brettanomyces*.

Myšina je výsledkem metabolismu ornitinu a lysinu, ze kterých vznikají velmi silné heterocyklické dusíkaté báze ACTPY, ACPY a ETPY. Ve víně je velmi snadno rozpoznatelná, protože chuť je velmi mdlá a na patře v ústech je cítit myší moč. Často má vyšší těkavé kyseliny a se jeví rozmazaně, oxidativně a štiplavě. (EDER ET AL., 2006)

4 Vliv volatilních látek na aromatický profil červeného vína

Volatilní látky, které vznikají při malolaktické fermentaci velmi zřetelně působí na aroma a chuť vína.

4.1 Aromatické látky v červeném víně

Aromatické látky jsou podstatné pro atraktivitu vína, sensorické hodnocení a dobrou rozpoznatelnost. Každá odrůda je příznačná jinými aromatickými látkami. Někdy může ve vůni převládat určitá aromatická látka typická pro danou odrůdu, ale obecně je aroma považováno za komplexní vjem způsobený projevem stovek aromatických látek. Ty se objevují ve slupkách hroznů a mění se v souvislosti se zdravotním stavem, zralostí, ročníkem, půdních podmínkách apod. Aroma vína je jedním ze základních ukazatelů kvality a umožňuje nám rozlišit vína vyrobená z jednotlivých odrůd.

Při tvorbě aromatické struktury hrají důležitou roli použité technologie při vinifikaci a kvasinky. Při výrobě vína je také významná existence prekurzorů každé odrůdy, které vytvářejí odrůdové aroma ve víně při pozdějším zrání. Aroma vína je vytvářeno několika stovkami těkavých látek, jejichž koncentrace se pohybují od několika nanogramů po několik miligramů. Za přítomnosti kyslíku se uvolňují, a proto jsou sensoricky dobře rozpoznatelné. Záleží na koncentraci, jaká se ve víně nalézá, protože každá z těchto látek má jiný práh vnímání.

Pro rozlišení charakteristiky jednotlivých sloučenin je využíváno pojetí prahových hodnot:

- Práh vnímání: To je minimální koncentrace, při které musí výskyt aromatických látek v trianglovém testu zaregistrovat alespoň 50 % degustátorů. Nemusí být ovšem schopni nazvat typ vůně.
- Práh rozpoznání: Toto je práh pro rozpoznání a pojmenování specifické aromatické sloučeniny.

- Práh preference: Je to maximální koncentrace, za jaké může být sloučenina přítomna, aniž by měla negativní charakter na kvalitu vína.

Vzor aromatických látek, které vznikají při malolaktické fermentaci je v tabulce 1.

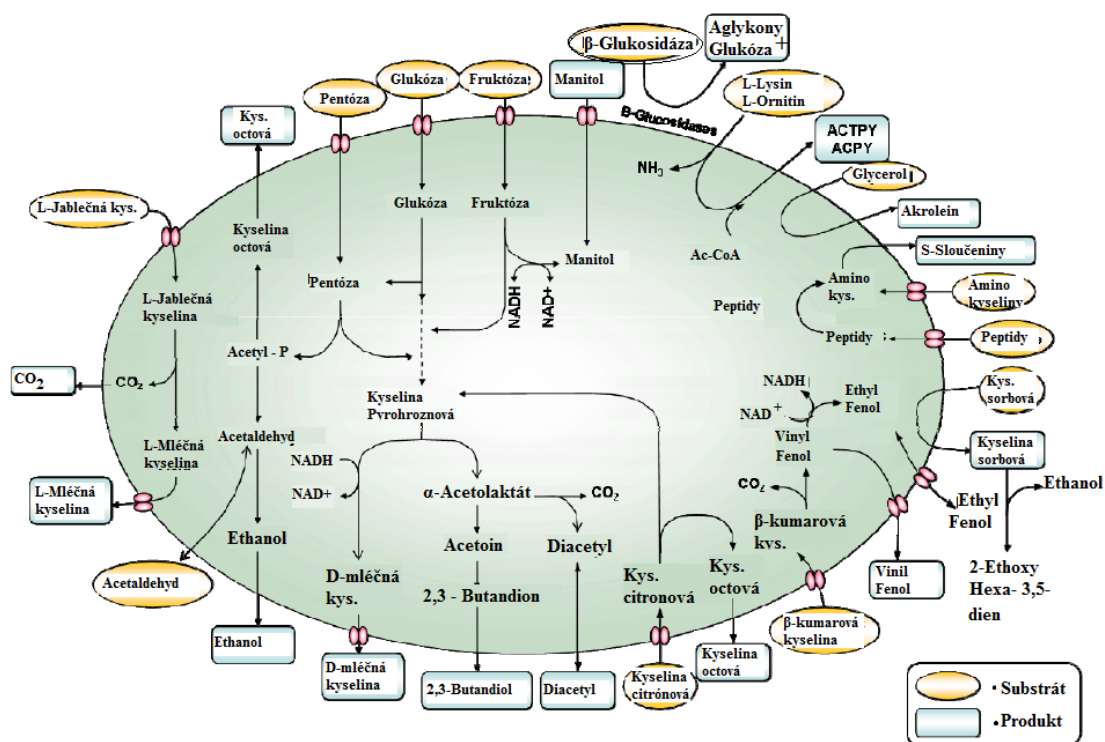
Tab. 1 Vzor aromatických látek vznikajících při malolaktické fermentaci

Aromatické látky	
Ovocné	Jahodová marmeláda, třešeň, ostružina, černý rybíz, malina, moruše, švestky, sušené fíky
Vegetativní, bylinné	Olivy, zelené fazole, chřest, zelený pepř, eukalyptus, posekaná tráva
Dřevnaté	Káva, kouř, pečený toust
Zemité	Lesní půda, houba
Sladké	Vanilka, med, karamel, mléčný bonbon
Kořenité	Směs orientálního koření, černý pepř, hřebíček, muškátový oříšek, skořice
Mléčné	Máslo, jogurt, krém, podmásli
Květinové	Růže, fialky
Ořechové	Mandle, vlašské ořechy, lískové ořechy

Zdroj: (MALHERBE, 2010)

Malolaktická fermentace je velmi významná pro charakter vína. Vylepšuje ovocné aroma a potlačuje vegetativní a travnaté vůně. Mléčné bakterie jsou schopné produkovat velké množství aromatických sloučenin. Biosyntéza a přeměna aromatických sloučenin MB je vyobrazeno na obrázku 6.

Pozornost je upřena na kmen bakterií, inokulaci MB a délce MLF. Kvalita výsledného vína může být zřetelně ovlivněna interakcí vína s jemnými kvasnicemi, které mají schopnost vzniklý zápach po MLF snižovat a tím zvýraznit ovocné aroma. (MALHERBE, 2010)



Obr. 6 Zjednodušené schematické znázornění biosyntézy a přeměny aromatických sloučenin mléčnými bakteriemi

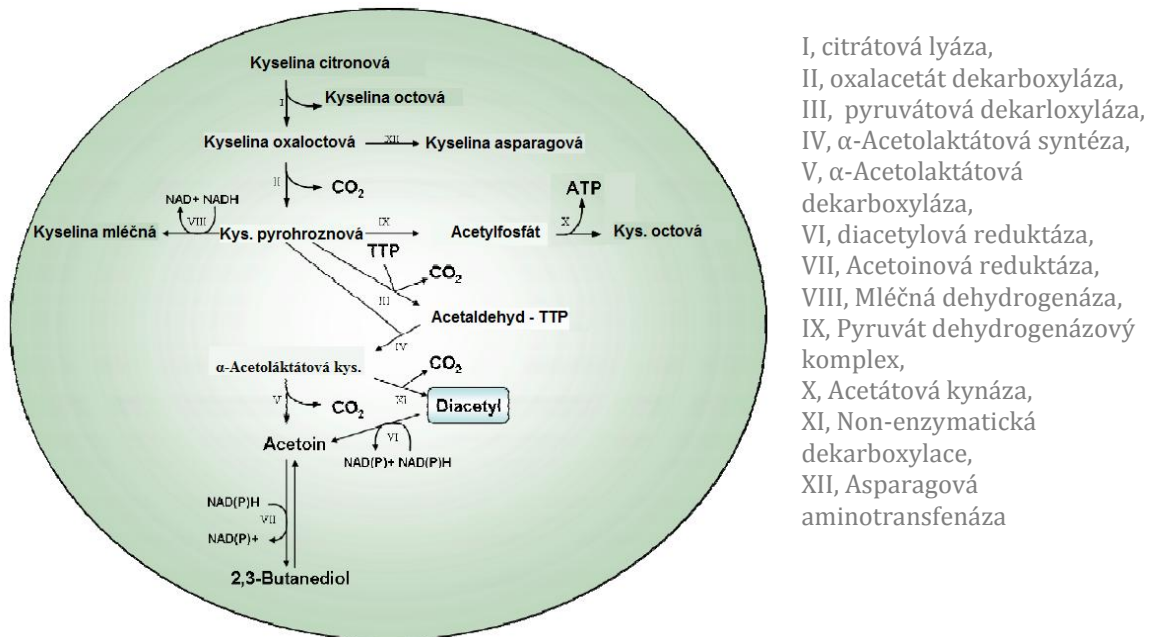
Zdroj: (MALHERBE, 2010)

4.2 Acetoinové sloučeniny

Diacetyl je někdy nazýván jako biacetyl. Jedná se o diketon, α -dikarboxylovou sloučeninu, která obsahuje na druhém a třetím uhlíku karboxylovou skupinu. Je to žlutá kapalina, která má ostrý máslový zápach a v potravinách má máslovou chuť a vůni. Tvorba a degradace diacetylů jsou spojeny s růstem mléčných bakterií a metabolismem kyseliny jablečné a citrónové. Mohou ho tvořit také kvasinky jako produkt alkoholové fermentace, ale ještě v jejím průběhu je přeměněn na acetoin a 2,3-butandiol, které jsou sensoricky nepostřehnutelné. Dočasně je diacetyl vnímán v červených vínech po MLF při vyšších koncentracích jako máslová pachuť. Časem se, ale snižuje nebo úplně ztrácí a může přispět k bohatosti vína. Je pokládán za jednu z nejdůležitějších sloučenin vyprodukovaných během MLF.

Kyselina pyrohličitá (pyruvát), která se odvozuje od metabolismu kyseliny citrónové a cukrů, stimuluje tvorbu diacetylů. Metabolismu diacetylů a kyseliny

citronové je na obrázku 7. Ten je tvořen jako meziprodukt metabolismu kyseliny citronové, který začíná až na konci MLF. Největší množství diacetylu se vytváří, když je asi 95 % kyseliny jablečné a 25 % kyseliny citronové transformován na kyselinu mléčnou.



I, citrátová lyáza,
 II, oxalacetát dekarboxyláza,
 III, pyruvátová dekarboxyláza,
 IV, α-Acetylaktátová syntéza,
 V, α-Acetylaktátová dekarboxyláza,
 VI, diacetyllová reduktáza,
 VII, Acetoinová reduktáza,
 VIII, Mléčná dehydrogenáza,
 IX, Pyruvát dehydrogenázový komplex,
 X, Acetátová kynáza,
 XI, Non-enzymatická dekarboxylace,
 XII, Asparagová aminotransferáza

Obr. 7 Metabolismu kyseliny citronové a diacetylu
 Zdroj: (MALHERBE, 2010)

Pyruvát je redukován na laktát během metabolismu sacharidů a pro udržení rovnováhy bakteriálních buněk je další pyruvát stanoven k produkci acetoinu a 2,3-butandiolu. V těchto reakcích pyruvát pochází z metabolismu cukrů a kyseliny citronové a v buněčném metabolismu přispívá k redoxní rovnováze 2,3-butandiol. Teoreticky MB vyrobí z 1 molu citrátu 2 moly CO₂, 1 mol kyseliny octové a 0,5 molu – diacetylu, acetoinu a 2,3-butandiolu. Kyselina pyrohroznová se dekarboxyluje přes α-acetylaktát na diacetyl. Transformace α-acetylaktátu na diacetyl je neenzymatická dekarboxylace, která se stupňuje přítomností kyslíku. Diacetyl je chemicky nestabilní, a proto je při reduktivní dekarboxylaci pyruvátu degradován na acetoin a ten může být dále metabolizován na polyol 2,3-butandiol.

Množství diacetylu závisí na více faktorech. Ukázalo se, že jeho tvorba je o něco vyšší v červeném víně než v bílém. Míru diacetylu hodně ovlivňuje použitý kmen

bakterií. Dále pak množství inokula MB na začátku a v průběhu MLF. Současné prodávané preparáty kultur *O. oeni* poskytují $0,5-5 \times 10^6$ buněk/ml při dodržení instrukcí na rehydrataci. Vyšší degradace kyseliny jablečné je spojená s rychlým nárůstem bakterií *O. oeni*. Menší koncentrace vedou k vyššímu množství diacetylu ve víně. Asi je to způsobeno délkou času na rozmnožení MB a průběh MLF. Kontakt kvasnic s vínem má velmi příznivý účinek, jak na intenzitu odbourávání kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou, tak na snížení diacetylu. Dalším činitelem je množství kyslíku při MLF. Při jejím průběhu má provzdušnění negativní vliv na produkci diacetylu. Za anaerobních podmínek se ho tvoří jen 2 mg/l a za aerobních podmínek až 12 mg/l. Proces MLF je vysloveně anaerobní. MB všeobecně preferují teplotu okolo 27 °C, ale v praxi se pro jejich růst a průběh MLF používá 20 – 22 °C. Při teplotě 18 °C a méně trvá proces odbourávání delší dobu a tvorba diacetylu je vyšší.

Bylo zjištěno, že se vlivem enzymatických redukcí po MLF hladina diacetylu snížila, naproti tomu se množství 2,3-butandiolu zvýšilo. Tato změna vyvolává pozitivní vliv na aroma červeného vína, protože acetoin a 2,3-butandiol mají vyšší práh vnímavosti (150 mg/l a 600 mg/l) a obsah diacetylu se v mladých vínech pohybuje v hodnotách 0,2 až 1,84 mg/l a u starších vín je uváděno 1,25 až 3,39. Tyto hodnoty neovlivňují červené víno negativně a spíše jim přidávají ořechové a karamelové aroma. Při množství diacetylu 5 – 7 mg/l je víno špatně hodnoceno, neboť je ve víně cítit velmi silný máslový až jogurtový tón a mnohdy také není výjimkou kysané zelí. (LERM ET AL., 2010; RIBÂREAU-GAYON ET AL., 2006; MINÁRIK, 2008)

4.3 Aldehydy

Acetaldehydy patří, co do množství mezi nejdůležitější karbonylové sloučeniny nacházející se v červeném víně. Zastupují 90 % z celkového množství aldehydů a při obvyklé koncentraci 10 až 200 mg/l se podílejí na ovocném a ořechovém aroma. Při prahovém množství 500 mg/l lze rozpoznat ostřejší chuť a travnaté, oxidační a jablečné aroma. Acetaldehyd je důležitý pro stabilizaci barvy v červených vínech. Jeho syntéza MB není ještě úplně objasněná, ale některé divoké kmeny by toho měly být schopny.

Kromě acetaldehydu jsou ostatní aldehydy přítomny ve stopovém množství. Alifatické aldehydy obsahující 3-5 atomů uhlíku mají v červeném víně zpravidla koncentraci 5 mg/l, kdež to (E)-2-nonenaly a další vyšší aldehydy mají obvykle úroveň mezi 0,1 až 5mg/l. Aldehydy s 8-10 atomy uhlíku jsou například octanal, nonanal, (E,Z)-2,6-nonadienal nebo (E)-2-nonenal. Ve víně je hodně patrný hlavně (E)-2-nonenal, který je odpovědný za vůni pilin a desek dřeva. Alifatické aldehydy jsou zodpovědné za travní a bylinné aroma a jsou to (E)-2-hexanal, (E)-2-heptanal a (E)-2-octenal. Aroma a koncentrace aldehydů je v tabulce 2. Oxidační aldehydy, které jsou přítomné ve víně, mají synergickou nebo aditivní interakci s jinými těkavými komponentami. Současné studie ukázaly, že některé kmeny *O. oeni* jsou zdatné redukovat vegetativní a travní aroma pocházející z nevyzrálých hroznů v průběhu MLF. Zatím nebylo zjištěno, do jaké míry ovlivňuje MLF a MB koncentraci aldehydů ve víně. (MALHERBE, 2010)

Tab. 2 Koncentrace a aroma aldehydů v červeném víně

Aldehydy	Aroma	Koncentrace (µg/)	Práh vnímání* (µg/l)
2-Methylpropanal	Čokoláda, slad	0,9-132	6,0
2-Methylbutanal	Čokoláda, slad	3,3-105	16
3-Methylbutanal	Čokoláda, slad	1,0-49	4,6
E-2-Hexenal	Byliny	0,02-1,6	4
E-2-Heptenal	Byliny	<0,16	4,6
E-2-Octenal	Byliny, citrón	0,04-4,1	3
E-2-Nonenal	Piliny, dřevo	0,1-3,7	0,6
Fenylacetaldehyd	Květiny, med, sladkost	2,4-130	1
*při 11 % alkoholu a pH 3,2			

Zdroj: (MALHERBE, 2010)

4.4 Estery

Estery jsou důležité pro určování profilu aromatických látek ve víně. Tato skupina sloučenin je kvalitativně jednou z nejdůležitějších kategorií těkavých sloučenin a představují primární zdroj ovocného aroma ve víně. Jsou vytvářeny jako kondenzační produkty mezi karboxylovými skupinami organických kyselin a hydroxylovými skupinami z alkoholů a fenolů a jsou produkovány buď důsledkem chemické

esterifikace nebo enzymaticky během zrání vína. Rozlišujeme dvě hlavní skupiny a to deriváty esterů, které jsou přisuzovány aroma ovoce a ethylestery mastných kyselin, které vznikají při biosyntéze lipidů enzymatickou esterifikací aktivovaných mastných kyselin. Acetátové estery jsou produkovány prostřednictvím kondenzace vyšších alkoholů a acetyl-CoA.

Nejvýznamnější estery, které se tvoří při MLF jsou diethyl-sukcinát a ethyl-laktát. Diethyl-sukcinát vzniká neenzymatickou esterifikací a jako vedlejší produkt je tvořena kyselina jantarová mikrobiálním metabolismem α -ketoglutarátu. Tento ester má práh vnímavosti 1,2 mg/l a podílí se na ovocných aromatech v červeném víně. Další významný ester ethyl-laktát je esterifikační produkt laktátu produkováný MB při MLF. Je důležitý pro své ovocné a krémové aroma a také se podílí na plnosti vína. Prahová detekce (S)-ethyl-laktátu je v červeném víně 110 mg/l. Vína, kde proběhla MLF je 90 až 150 mg/l a kde nebyla úspěšně provedena jen 5-8 mg/l. Koncentrace vybraných esterů je v tabulce 3.

Tab. 3 Vybrané estery v červeném víně

Estery	Aroma	Koncentrace ($\mu\text{g/l}$)		Práh vnímání* ($\mu\text{g/l}$)
		Mladé č. víno	Staré č. víno	
Ethyl-hexanoát	Jablko, ovoce	1,53-6,22	0,25-2,55	5-14
Ethyl-octanoát	Ovoce, špek	138-783	162-519	2-5
Ethyl-butyrát	Jablko	69,2-371	20-111,8	20
Isoamyl-acetát	Banán	1,1-4,3	2,4-3,3	0,9-12
2-Fenylethyl-acetát	Růže, med, tabák	0,54-8	nr ^b	0-9
nr ^b = tato hranice není hlášena v žádné studii;		*při 11 % alkoholu a pH 3,2		

Zdroj: (MALHERBE, 2010)

Na snižování nebo zvyšování koncentrací esterů působí výběr vhodného kmene bakterií. Různými studiemi bylo vyzkoumáno, že hladina acetát-esterů se během MLF snížila, ale velký podíl na tom množství použitých bakterií. To způsobilo snížení sensorických deskriptorů, např. vegetativních tónů nebo aroma po bobulovém ovoci, ale také isoamyl-acetátů a 2-fenylethyl-acetátů. Další faktem, co může způsobit pokles

esterů je výběr kmene *O.oeni* a výživa pro bakterie. Bylo zjištěno, že kmen MB vykazující cholinesterázu, tzn., že hydrolyza esterů podporuje tvorbu aromatických látek v červeném víně. Různé studie prokázaly, že většina kmenů *O. oeni* a *Lactobacillus* má aktivní cholinesterázu a je schopna ovlivňovat tvorbu aromatických látek. (LERM, 2010; RIBÂEREUA-GAYON, 2006; JACKSON, 2008)

4.5 Glykosidy

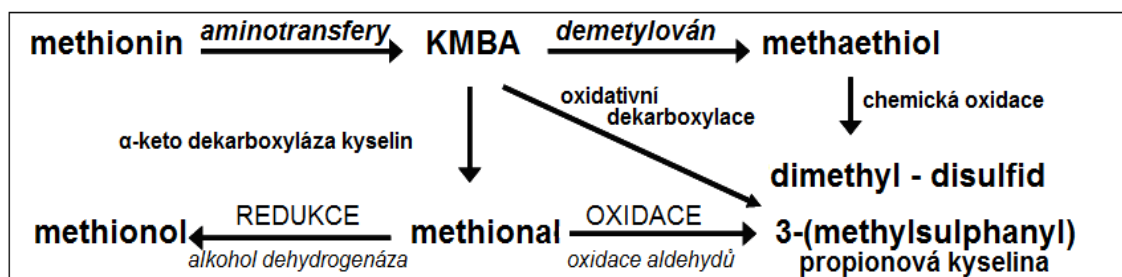
Velké množství aromatických látek je ve víně vázané na cukry v neaktivní formě v podobě glykosidů. Ty představují potenciální zásobárnu aromatických látek. Ve volné formě jsou tyto látky těkavé a mnohou přispět k celkové komplexnosti vinného aroma. K sensoricky důležitým látkám patří C13-norisoprenoidy, monoterpeny, alifatické sloučeniny a deriváty benzenu. Mléčné bakterie, hlavně *O. oeni* jsou schopné uvolňovat tyto těkavé látky. Enzymatická činnost je závislá na chemické struktuře vína, bakteriálním kmeni a růstové fáze bakterií.

Z vína jsou z glykosidických prekurzorů vlivem bakteriálních kmenů *O. oeni* a *Lactobacillus* uvolňovány norisoprenoidy, fenoly, terpeny a vaniliny. Velké změny v aromaticce červeného vína způsobují již malé změny koncentrací těchto látek. Uvolňování těkavých látek vázaných na cukry vyžaduje působení enzymu β -glukosidázy. Na jeho působení má velký vliv kultivar odrůdy, teplota, pH ethanol. V kyseljším prostředí mohou být aktivní látky inhibující enzymatickou aktivitu a denaturační látky. Bakterie *O. oeni* jsou schopné zachovat aktivitu β -glukosidázy z 80 % při pH 3,5. Pro uvolňování aromatických látek z červeného vína je nutné pozorovat různé stresové faktory, jako je SO_2 a ethanol, které by mohly mít vliv na enzymatickou činnost startovacích kultur MB. Glykosidy mohou pozitivně přispívat k aromaticce vína, které se vytváří při MLF. (LERM, 2010; RIBÂEREUA-GAYON; MALDHERBE, 2010)

4.6 Sirné sloučeniny

Sirné sloučeniny se výrazně podílejí na sensorické struktuře vína. V anorganické formě pocházejí v první řadě z oxidu siřičitého, který se do vína přidává pro jeho

antimikrobiální a antioxidační vlastnosti. Dále je tvoří kvasinky při alkoholové fermentaci. Kvasinky mohou produkovat mezi 10 až 30 mg/l SO₂. Některé kmeny však až 100 mg/l. Toto široké rozpětí je přisuzováno rozdílné koncentraci methioninu a cysteinu (esenciální aminokyseliny) a kolísající úrovni asimilovatelného dusíku. Mechanismus produkce čtyř hlavních sírných sloučenin je na obrázku 8. Nezanedbatelnou roli hraje genetická dispozice jednotlivých kmenů. Některé sírné sloučeniny se mohou do vína dostat z fungicidů obsahující síru na ošetření vinice proti plísním.



Obr. 8 Produkce čtyř hlavních těkavých sírných sloučenin tvořených metabolismem mléčných bakterií
Zdroj: (LERM ET AL., 2010)

Hlavní organické látky obsahující síru jsou dvě aminokyseliny (cystein a jeho derivát methionin), tripeptid (glutathion) a proteiny obsahující cystein a methionin. Vitamíny obsahující síru (thiamin a biotin) se vyskytují při vyšší koncentraci v moštu než ve víně. Některé sírné sloučeniny se podílí negativně na aromaticitě vína – např. sirovodík (H₂S), ethanethiol a methanethiol. Pozitivně podporuje aromaticitu – např. methionin, dimethyl-disulfid (DMS) nebo charakteristické odrůdové aroma – např. některé těkavé thioly. MB jsou zdatné metabolizovat při MLF methionin a produkovat mnohé sírné sloučeniny. Přesný biochemický mechanismus produkce sírných sloučenin není prozatím zcela prozkoumán, ale je předpoklad, že je produkují *O. oeni* methioninu na dimethyl-disulfid, methanethiol, 3-(methylsulphanyl) propionové kyseliny, 3-(methylsulphanyl) propanan-1-ol (také je známý jako methionol).

Zvýšené množství těchto látek jsou schopné způsobit negativní aroma vína, ale při nízkých koncentracích se podílí na zajímavosti aroma červeného vína. S redukční pachutí jsou spojeny vyšší hodnoty 3-propan-1-olu a methanethiolu. Deformace

způsobené produkcí těkavých sirných sloučenin jsou podřízené na použitém kmeni *O. oeni* ve srovnání s rodem *Lactobacillus*. Dále ovlivňují produkci sirných sloučenin různé faktory, jako jsou růstové fáze MB nebo přítomnost methioninu jako prekurzoru. Bylo zjištěno, že k výrobě 3-propionové kyseliny dochází v průběhu exponenciální, ale také stacionární fázi růstu, kdežto k produkci methionolu dochází v exponenciální fázi růstu MB. K produkci 3-(methylthio) propionové kyseliny a methionolu dochází v přítomnosti methionalu, což značí, že tato sloučenina je významným prekurzorem při jejich produkci. Při tvorbě těkavých sirných sloučenin MB *O. oeni* vznikají meziprodukty methional a 2-oxo-4-(methylthiol) máselná kyselina (KMBA). Oxidativní dekarboxylací KMBA se přeměňuje methional na methionol a 3-(methylthiol) propionové kyseliny. KMBA také slouží jako prekurzor pro produkci dimethyl-disulfidu a methanethiolu.

MB jsou zdatné tvořit všechny čtyři produkty, ale pouze u 3-(methylsulphanyl) propionové kyseliny dochází u červených vín k zřejmému zvýšení. Výrazný vliv na vnímání 3-(methylsulphanyl) propionové kyseliny mají další látky. Tóny čokolády a pražených mandlí jsou registrovány do 50 mg/l, ale po pětinašobném zvýšení koncentrace, to je asi 244 mg/l, lidské sensorické deskriptory vnímají aroma červených plodů a zemité nuance. Po MLF mohou nastat neenzymatické reakce mezi cysteinem obsahující síru a α -dikarbonylovými sloučeninami, při kterých vznikají tetramethylpyraziny a trimethyloxazoly. Obvykle jsou přisuzovány oxidativním a připečeným aromatům, ale také vůněmi po kvašeném zelí. Po určitém čase jsou tyto vůně redukovány a do popředí se dostává ovocné a odrůdové aroma. (LERM, 2010; RIBÂÉREAU-GAYON, 2006)

Koncentrace a aroma sirných sloučenin je v tabulce 4.

Tab. 4 Těkavé sirmé sloučeniny v červeném víně

Sírné sloučeniny	Aroma	Prekurzory	Koncentrace	Práh vnímání (µg/l)
Methanethanol	Vařené zelí, cibule	Methionin	2,1-5,1	0,3
Dimethyl-disulfid	Vařené zelí, intenzivní cibule	Methanethiol	2	15-29
3-(methylsulphanyl)propan-1-ol	zelí	Methionin	140-5000	500
3-(methylsulphanyl)propionová kyselina	Čokoláda, připálenina	Methionin	0-1811	244

Zdroj: (MALHERBE, 2010)

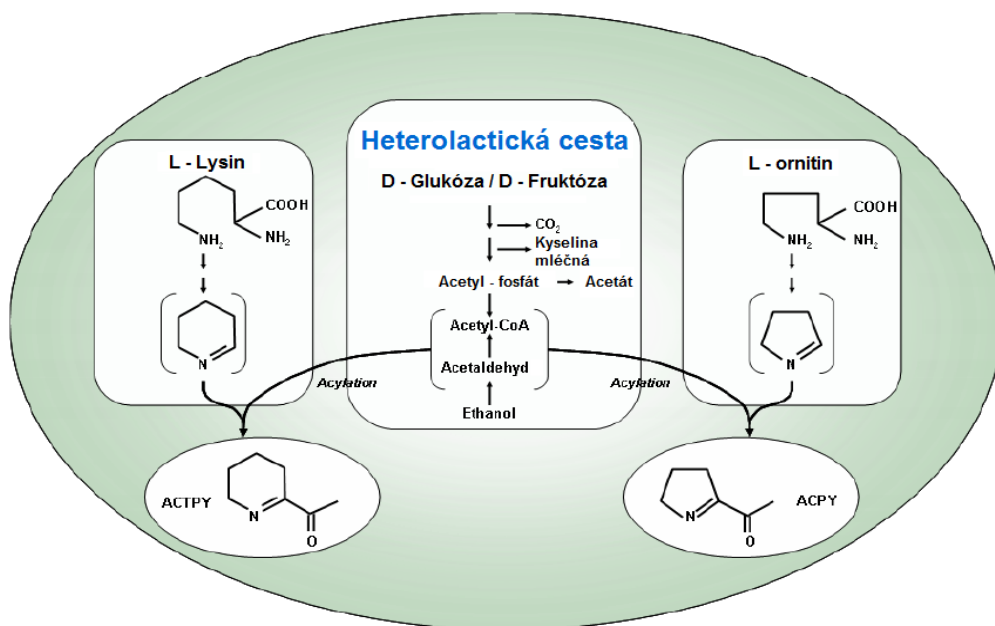
4.7 Dusíkaté sloučeniny

Dusíkaté sloučeniny obsahují proteiny, které lze rozdělit na proteázy a peptidázy. Ty se pak ještě dělí na peptidy a aminokyseliny, které mohou ovlivnit sensoriku vína. Mléčné bakterie jsou velmi náročné v požadavcích na aminokyseliny a některé produkují enzymy potřebné pro získání peptidů a aminokyselin. MB *O. oeni* jsou schopné produkovat peptidy a aminokyseliny během MLF. I když jsou peptidy významným zdrojem aminokyselin, mohou přispívat k různým pachutím v červeném víně.

Odpovědnost za znehodnocení vína jsou heterocyklické dusíkaté báze, které jsou schopné produkovat mléčné bakterie během MLF. Mezi ně patří 2-acetyltetrahydropyridin (ACTPY), 2-acetyl-1-pyrrolin (ACPY) a 2-ethyltetrahydropyridin (ETPY). Odpovědnost za produkci nesou heterofermentativní MB, jako jsou některé druhy rodu *Lactobacillus*, kmeny *Leuc. mesenteroides* a divoké kmeny *O. oeni* prostřednictvím metabolismu určitých aminokyselin, jako je lysin a ornitin. Negativně hodnocená vína obsahují 2,7 až 18,7 ETPY, 4,8 až 106 mg/l ACTPY a 2,7 až 7,8 mg/l ACPY. Tyto sloučeniny mohou být přítomny ve víně buď jednotlivě, nebo společně. Vznik dusíkatých heterocyklických sloučenin se odlišuje preferencí MB. *Oenococcus oeni* produkují v chuti nejméně vnímané ETPY. *Laktobacilly* a *pediococci* produkují nejvíce sloučeninu ACPY, která

ve víně vykazuje špatné hodnocení. Produkce nepříjemných pachutí dusíkatých sloučenin je znázorněná na obrázku 9.

Přes různé výzkumné úsilí, pokud jde o MLF dusíkaté sloučeniny se nepodařilo přesně definovat proteolytický a peptidolitický systém MB a následný vliv na sensorické vlastnosti. (LERM, 2010; MALDHERBE, 2010)



Obr. 9 Znázornění vzniku silné a nepříjemných pachutí dusíkatých sloučenin 2-acetyltetrahydropyridinu (ACTPY) a 2-acetyl-1-pyrrolin (ACPY) některými mléčnými bakteriemi
Zdroj: (MALHERBE, 2010)

4.8 Těkavé fenoly

Červené víno obsahuje vyšší obsah fenolických sloučenin, které jsou extrahovány ze slupek hroznů během kvašení. Z nich hlavně ferulové kyseliny a β -kumarové kyseliny mohou být používány jako živiny MB a k produkci těkavých fenolických sloučenin.

Bakterie *Lactobacillus* a *Pediococcus* obsahují enzymy cinnamátdekarboxylasy, které degradují β -kumarové kyseliny na 4-vinylfenol a ferulové kyseliny na 4-vinylguajakol. Můžeme je zjistit podle typického farmaceutického zápachu, ale ty se vyskytují ve větší koncentraci v bílých vínech než v červených. Tyto sloučeniny jsou

pak enzymaticky degradovány kvasinkami *Brettanomyces* na silně zapáchající, 4-ethylguajakoly a 4-ethylfenoly. Ty jsou vnímatelné při koncentraci přes 600 mg/l.

Podle svých koncentrací mohou ve vínech vyvolávat čichové vady fenolového typu, zápachy po kůži, koňském potu nebo koňské stáji. (LERM, 2010, MICHLOVSKÝ, 2014)

4.9 Kyselina octová

Kyselina octová tvoří hlavní podíl těkavých kyselin vína, jak kvantitativně, tak i sensoricky. Je produktem metabolismu mikroorganismů. Při koncentraci nižší než 0,2 až 0,6 g/l může přispět k pestrosti vinného aroma. Sensoricky lze kyselinu octovou postřehnout již při koncentraci 0,7 g/l. Projevuje se pichlavou vůní v nose a ostrou a škrábavou chutí.

Kyselinu octovou můžou produkovat především octové bakterie *Acetobacter sp.* a v menší míře MB *Leuconostoc oenos*, některé kmeny *Lactbacillus sp.* a *Pediococcus sp.*. Větší množství vyrábí také kvasinky. Při MLF se vytvoří obvykle od 0,1 do 0,2 g/l kys. Octové, a to z neprokvašených cukrů nebo při tvorbě diacetylu z kyseliny citrónové. (LERM, 2010; MINÁRIK, 2005)

4.10 Těkavé mastné kyseliny

Těkavé mastné kyseliny jsou produkovány hydrolýzou tri-, di- a monoacylglycerolů (lipidy). Víno se skládá ze směsi rozvětvených nenasycených mastných kyselin a lineárních nenasycených mastných kyselin. Ty jsou obvykle nazývány jako krátké řetězce (C2-C4), střední (C6-C10) nebo s dlouhým řetězcem (C12- C18). Pokud jsou od mastných kyselin odvozeny těkavé látky, jako aldehydy, estery a ketony mohou v menších koncentracích přispívat k rozmanitosti aroma červeného vína. Koncentrace mastných kyselin, které jsou přítomné ve víně, jsou v tabulce 5.

Při vyšších koncentracích přidávají vínu zpoceně a sýrové pachy nebo žluklé a štiplavé pachy. K výraznému zvýšení koncentrace kyselin oktanové, hexanové

a dekanové dochází po dokončení MLF a jejich změna nastává v závislosti na použitém kmeni. (LERM, 2010)

Tab. 5 Těkavé mastné kyseliny přítomné ve víně

Kyseliny	Aroma	Koncentrace ($\mu\text{g/l}$)		Práh vnímání* (mg/l)
		Mladé č. víno	Staré č. víno	
Isomáselná kyselina	Žluklost, máslo, sýr	0,43-2,34	3,51-7,68	2,3
Isovalerová kyselina	Pot, kyselost, žluklost	0,30-1,15	1,06-3,5	3,3
Máselná kyselina	Žluklost, sýr, pot	0,43-4,71	2,02-4,48	1,7
Propionová kyselina	Punčovost, sýr, pot	nr ^b	4,16-11,9	8,1
Hexanová kyselina	Pot	0,85-3,78	1,44-5,83	4,2
Oktanová kyselina	Pot, sýr	0,56-4,66	1,09-4,97	0,5
Dekanová kyselina	Žluklost, tuk	0,06-0,85	0,29-2	1

nr^b = tato hranice není hlášena v žádné studii; *při 11 % a pH 3,2

Zdroj: (MALHERBE,2010)

4.11 Vyšší alkoholy

Vyšší alkoholy jsou tvořeny dekarboxylací a následnou redukcí α -keto kyselin. Tyto kyseliny jsou vyrobeny jako meziprodukty při biosyntéze aminokyselin existujících ve víně v Ehrlichově metabolické dráze. Biosyntéza aminokyselin je zodpovědná za většinu vyšších alkoholů vyprodukovaných při kvašení. Při koncentraci menší než 300 mg/l přispívají k ovocnému a rozmanitému aroma. Při koncentraci vyšší jak 500 mg/l může být aroma vína pokaženo chemickými tóny. Koncentrace a aroma vyšších alkoholů je znázorněná v tabulce 6.

Bylo prokázáno, že MLF množství vyšších alkoholů nějak podstatně neovlivňuje. Může být pozitivní, že MB nemají schopnost tvořit velké množství vyšších alkoholů, protože většina kmenů by produkovala vůně připomínající rozpouštědla. (LERM, 2010)

Tab. 6 Vyšší alkoholy vyráběné bakteriemi při malolaktické fermentaci

Vyšší alkoholy	Aroma	Koncentrace ($\mu\text{g/l}$)		Práh vnímání* (mg/l)
		ML. č. víno	St. č. víno	
Isobutylalkohol	Hořkost	25,7-86,9	57,2-230	50
Isoamyl-alkohol	Likérovost, sladkost, připálenina	83,95-333	165-472	300
2-Phenylethanol	Med, koření, růže, šerik	9-153	24-166,6	5-138

*při 11 % alkoholu a při pH 3,2

Zdroje: (MALHERBE, 2010)

5 Materiál a metodika

Pro přípravu vzorků byly použity hrozny z odrůd André, Frankovka a Cabernet Moravia z katastru Moravský Žižkov.

5.1 Popis stanoviště odběru vzorků

Hrozny pro tuto experimentální část byly sbírány ve vinicích Moravského Žižkova v trati Stará hora ve Velkopavlovické vinařské podoblasti.

Malebná vesnička Moravský Žižkov patří k nejmladším obcím na Břeclavsku. Byla založena v roce 1731 zásluhou Jana Maxmiliána Žižky, inspektora a správce břeclavského lichtenštejnského panství. V současné době v obci žije cca 1400 obyvatel. Současná výměra katastru činí 1391 ha a z toho je 115 ha vinic.

Na jižní Moravě jsou počátky pěstování vinné révy spojeny s příchodem římských vojsk. Také na žižkovském katastru se réva pěstovala dlouho před samotným vznikem obce. Týká se to zejména vinic v trati Stará hora, která patřila původně k sousedním Velkým Bílovicím, kde jsou vinohrady v písemných pramenech zmiňovány už ve 14. století.

Trať Stará hora se rozkládá na jihovýchodním svahu mírného kopce s půdou jílovitohlinitou až písčitohlinitou. Dává výborná bílá vína Ryzlinku rýnského a vlašského, Veltlínského zeleného, ale také modrých odrůd Frankovky, Modrému Portugalu a Cabernet Moravie. (ČECH, 2014)

5.2 Meteorologické zhodnocení roku 2014

Povětrností podmínky v roce 2014 přichystaly vinařům mnoho nemilých situací, s nimiž se musel každý podle svého vypořádat. Počátkem byla mírná zima bez sněhové pokrývky a postupovalo to suchým jarem a vlhkým koncem léta a podzimem.

5.2.1 Teplotní poměry

V důsledku teplé a suché zimy 2013/2014 docházelo v období rašení révy k přemnožení osenic, které vyžíraly očka révy. Mírné zimy naší přírodě asi opravdu nesvědčí a každá odchylka od běžného vývoje má většinou negativní vliv. Teplé zimní

období bylo přerušeno pouze ke konci ledna krátkým ochlazením. Z pohledu kvality hroznů bylo určitě méně příznivé ochlazení ve druhé polovině srpna. Podzim byl zase teplotně nadnormální, tak jako začátek zimy. K teplotám odpovídajícím dlouhodobému normálu se ochladilo až těsně před koncem roku. K jedinému zásadnějšímu ochlazení, které někteří trpěliví vinaři využili ke sběru hroznů na výrobu ledového vína, se vyskytlo 25. ledna, ale na více místech až 26. ledna. Pod bodem mrazu se teploty před tímto datem ani potom příliš nevyskytovaly. K promrznutí půdy došlo na většině lokalit jen průběhem krátkého několikadenního období koncem ledna a počátkem února, a to maximálně do hloubky 10 centimetrů.

Z důvodu teplé zimy došlo k dřívějšímu rašení révy a mohlo dojít k poškození jarními mrazíky. Naštěstí se tak nestalo a nebylo hlášeno žádné vážnější poškození. I když bylo léto teplotně nadnormální, nevyskytovaly se nijak zvlášť vysoké maximální teploty vzduchu. Hranice tropického dne byla překročena jen málokdy, díky čemuž nebyly hlášeny žádné škody způsobené slunečním úpalem. Srpnové ochlazení způsobilo pokles v hodnotách denních efektivních teplot. Toto ochlazení bylo doprovázeno také četnějšími dešti, které zapříčinily rozvoj plísňě šedé a následné brzké sklizni. Nemohl tak být plně využit teplotní potenciál loňského ročníku, protože ke konci září a na počátku října začaly teplotní sumy dosahovat vyšších hodnot než v roce 2013. Teplotní poměry loňského roku byly příznivé, ale na kvalitě hroznů se nemohly plně projevit.

5.2.2 Srážkové poměry

I když celkový úhrn srážek za loňský rok byl průměrný a na některých místech i nadprůměrný, jejich rozložení z časového i prostorového ohledu bylo hodně nerovnoměrné. Lze říci, že srážky, které byly pro vinohrad přínosné, se vyskytly pouze v krátkém časovém období. Zima a jaro byly poměrně suché a navíc následovaly po suchém podzimu 2013. K mírné srážkové činnosti došlo v květnu, leč červen byl zase beze srážek. Výraznější srážková aktivita nastala v srpnu, hlavně v jeho druhé polovině. Problém s plísní šedou v tomto a následujícím období nevyvolal celkový úhrn srážek, ale spíše vysoký počet dnů s deštěm, protože v některých týdnech bylo zaznamenáno 4 až 6 srážkových dnů, skutečně tedy každý anebo každý druhý den v týdnu. Tvořily se tak dlouhé periody ovlhčení nejen listů, ale i bobulí, které nápadně

přispělo k propuknutí infekce. Značné úhrny v polovině září naopak komplikovaly sklizeň, na většině lokalit předčasnou, a pomohly i ke snížení slibně se vyvíjející cukernatosti hroznů. (LITSCHMANN, 2015)

5.3 Použitý materiál

K analýze byla vyrobena vína z odrůd: André, Cabernet Moravia, Frankovka.

5.3.1 André (An)

Původem se jedná o českou odrůdu, kterou vyšlechtil v roce 1961 J. Horák a kol. ve Velkých Pavlovicích křížením odrůd *Frankovka* x *Svatovavřínecké*. Do státní odrůdové knihy byla zapsána v roce 1980. Charakterizuje ji dobrá mrazuvzdornost. Odolnost proti plísni révové a padlí révovému je nízká, proti plísni šedé střední. Plodnost je vyšší 10 – 15 t/ha, cukernatost v moštu se většinou pohybuje mezi 17 - 20 °NM, obsah kyselin je 9 – 11 g/l . Odrůda vyžaduje dobré, teplé a slunné polohy, půdy nejlépe hlinité. Vína dle ročníku bývají kvalitní, harmonická, v chuti plná, typicky odrůdová s intenzivní červenou barvou. V mladém věku bývají tvrdší, a proto vyžadují delší zrání.

5.3.2 Cabernet Moravia (CM)

Je česká odrůda vyšlechtěná L. Glosem v Moravské Nové Vsi. Vznikla křížením *Cabernet Franc* x *Zweigeltrebe*. Do státní odrůdové knihy byla zapsána v roce 2001. Odolnost proti houbovým chorobám je střední až nízká, citlivá je hlavně na plíseň révovou. Plodnost je vyšší a to 9 -15 t/ha , cukernatost v moštu se pohybuje mezi 17 - 19,5 °NM, obsah kyselin bývá 7 – 9,5 g/l .

Pro výrobu kvalitního vína jsou vhodné velmi teplé slunné polohy, ale na půdu zvláštní nároky nemá. Vína mívají granátovou barvu. Jsou plná a po odbourání kyseliny jablečné jsou harmonická s kabernetovou vůní. Zráním vína se stupňuje plnost i harmonie.

5.3.3 Frankovka (Fr)

Původ odrůdy není přesně známý. Za místo vzniku je považováno Německo (Württemberg), Rakousko (Vöslau, Burgenland) nebo i Chorvatsko (Lemberg). Křížení doposud není známo. Do státní odrůdové knihy byla zapsána roku 1941. Vyznačuje se dobrou mrazuvzdorností a proti houbovým chorobám má odolnost nízkou.

Plodnost je střední 9 -11 t/ha, cukernatost v moštu je 17 – 19,5 °NM, obsah kyselin je 9 – 12 g/l. Odrůda je náročná na dobré slunné polohy a mírně záhřevné půdy. Dobře snáší sucho i vyšší obsah Ca v půdě. Vína při dobré zralosti jsou kvalitní, plná, s výraznějšími tříslovinami a typickou odrůdovou vůní a chutí. Jsou vhodná pro archivaci v lahvi nebo zrání v barikových sudech. (SOTOLÁŘ, 2006)

5.4 Příprava vzorků

Pro přípravu vzorků byly použity hrozny odrůd André, Cabernet Moravia a Frankovka. Vinice jsou vedeny na středním vedení s jedním ramenem a jedním čípkem. V jednom mezi řadí je přírodní tráva a ve druhém černý úhor. V příkmeném pásu se používá výkyvná sekce. I přes vysoký tlak padlí se po celou dobu vegetace podařilo udržet vinici ve výborném stavu.

V polovině měsíce srpna bylo provedeno odlistění zóny hroznů pro dobrou fenolickou zralost a dobré anthokyanové zbarvení. I když průběh podzimu byl v některých dnech dosti deštivý a hrozilo napadení *Botritis cinerea*, tak se podařilo udržet hrozny v dobrém zdravotním stavu. Sklizeň proběhla ručně do velkoobjemových beden. U André 11. října a u Cabernet Moravie a Frankovky 15. října.

Ihned po sklizni byly hrozny dopraveny do sklepního hospodářství a v krátkém čase odstopkovány do 500 litrových kádí. Rmut byl následně ošetřen proti oxidaci pyrosulfitem draselným na aktivní dávku 10 mg/l oxidu siřičitého a doslazen na cca 23°NM. Dále byl zakvašen AVSK a kádě zakryty umělohmotnou folií. Do jednoho vzorku každé odrůdy jsem po dvou dnech přidal bakterie *Biostart Forte SK2*. U dalších vzorků proběhla alkoholová fermentace bez přidání bakterií. Alkoholová fermentace trvala 12 dní u André, 15 dní u Frankovky a Cabernet Moravie.

Po bezproblémovém průběhu následovalo lisování na pneumatickém lisu na 0,6 baru a stáčení do plastových 400 litrových nádrží. Po třech dnech byla vína stočena z hrubých kalů do 50 litrových keg sudů. Jeden vzorek z každé odrůdy byl zasířen pyrosulfitem draselným na 35 mg/l oxidu siřičitého a přidán lysozym pro zabránění aktivity MB. Do dalšího vzorku byly přidány bakterie *Biostart Vitale* SK11. Další vzorek byl ponechán spontánní malolaktické fermentaci. Do posledního stáčeného vzorku už byly bakterie přidány na začátku alkoholové fermentace.

Vzorky u kterých je snaha, aby MLF neproběhla, byly umístěny v místnosti s konstantní teplotou 8 °C. Ostatní byly dány do místnosti, ve kterých se teplota udržovala pomocí přímotopu na 22 °C. Všechny vzorky spolehlivě nastartovaly MLF a měly bezproblémový průběh. Odbourávání bylo ukončeno zhruba koncem února. Vína se začala čistit a byly provedeny stáčky. Po stočení byly vína ponechány zrání na jemných kalech, a pak byly provedeny rozbory.

5.5 Použité bakterie

Pro malolaktickou fermentaci byly použity mléčné bakterie od firmy Erbslöh. Tato německá firma, která má sídlo v Geisenheimu je předním dodavatelem přípravků do vína.

5.5.1 BioStart Vitale SK11

Jedná se o vysoce koncentrovanou startovací kulturu mléčných bakterií, které jsou v sušeném a zamraženém stavu. Jsou vhodné pro přímé spuštění malolaktické fermentace v červeném a bílém víně. Bakterie jsou povoleny aktuálními zákony a předpisy platných v rámci Evropské unie. Kvalita a čistota produktu jsou ověřeny specializovanými laboratořemi. Přípravek byl pečlivě vybrán a izolován ze samovolných malolaktických fermentací kmenů *Oenococcus oeni* a byl testován v extrémně těžkých podmínkách.

Kmen *Oenococcus oeni* byl zvolen pro svoje výborné rozmnožovací schopnosti, zvýšenou vitalitu a také pro svou schopnost provést bezpečné a rychlé odbourání kyseliny jablečné. Bakterie snáší nízkou hodnotu pH a chladné teploty. Při výběru tohoto kmene byl kladen velký důraz na vysoké koncentrace alkoholu a vyšší hodnoty

SO₂. Zaručují MLF bez tvorby histaminu a pouze bezvýznamné tvoření těkavých kyselin.

5.5.2 BioStart Forte SK2

Jedná se mléčné bakterie pro přímé spuštění MLF v červeném víně. Jsou k dostání v sušeném a zamraženém stavu. Tento nový kmen je schopný odbourávat kyselinu jablečnou i za velice těžkých podmínek. Kvalita je zaručena certifikátem ISO 9001 a jejich použití je povoleno současnými předpisy. Jsou schopné provádět MLF i při velmi nízkých teplotách a nízkého pH s velmi malou tvorbou těkavých kyselin.

Je možné je použít po alkoholové fermentaci, ale také na začátku a v průběhu AF. Na začátku kvasného procesu je ideální očkovat MB 24 hodin po aktivaci kvasinek. Po úspěšném provedení dojde k přeměně kyseliny jablečné na jemnější kyselinu mléčnou a snížení kyselosti. Vína vynikají hebkostí a plností. Jsou mikrobiologicky stabilnější a potřeba SO₂ je nižší. (ERBSLÖH, 2015)

5.6 Pokusné varianty MLF

Pro účely této práce bylo vyrobeno 12 vzorků vín ze tří modrých odrůd révy vinné. Jednalo se o odrůdy André, Cabernet Moravia a Frankovka. Pokus byl zaměřen na sledování výskytu aromatických látek u vzorků, u kterých MLF neproběhla a u vzorků, u kterých byly provedeny odlišné způsoby MLF. Tyto odrůdy byly pro pokus vybrány z toho důvodu, protože kvůli obsahu kyselin je téměř nezbytné provádět MLF skoro v každém ročníku. Tento pokus může být zajímavý pro více vinařů, kteří každoročně řeší, jaký typ MLF použít.

5.7 Metody měření

Vzorky moštů byly vyhodnoceny v akreditované laboratoři BS vinařské potřeby Velké Bílovice. Vzorky vín byly vyhodnoceny v laboratoři v ústavu Vinohradnictví a vinařství v Lednici.

U hroznů z experimentálních variant při sklizni byly zkoumány tyto kvalitativní parametry: cukernatost, obsah veškerých titrovatelných kyselin, pH, těkavé kyseliny, obsah kyseliny vinné, obsah kyseliny jablečné a obsah kyseliny mléčné.

5.7.1 Stanovení cukernatosti moštu refraktometricky

Cukernatost v moštu stanovíme na základě měření indexu lomu světla refraktometrem jako rozpustnou sušinu moštu vyjádřenou v hmotnostních % sacharózy.

Stanovení titrovatelných kyselin (EEC No 2676/90)

Veškeré titrovatelné kyseliny (celkovou kyselost) můžeme objasnit jako sumu sloučenin titrovatelných odměrným alkalickým roztokem do pH 7. Do veškeré kyselosti se nezahrnuje kyselina uhličitá.

Chemikálie: 0,1 mol/l roztoku NaOH

Pomůcky a přístroje: 50 ml kádinka, 25 ml byreta, 50 ml pipeta, odsávací baňka, magnetická míchačka, pH metr, vodní vývěva

Postup: Nejprve je potřeba nakalibrovat pH metr při 20 °C na standardní tlumivý roztok o pH 7. Dále si za stálého třepání odstraním oxid uhličitý z asi 50 ml testovacího vína, které je v odsávací baňce zapojené na vodní vývěvu. Do titrační kádinky pipetou odměříme 10 ml nachystaného vína, pak přidáme 10ml destilované vody a do směsi se musí ponořit kombinovaná elektroda měřící pH. Při neustálém míchání přidáváme pomalu byretou 0,1 mol/l roztok NaOH do pH rovnající se hodnotě 7 při 20 °C.

5.7.2 Stanovení pH

Ve směsích jako jsou hroznový mošt a víno, může být kyselost měřena dvěma způsoby: kvantitativně (titrovatelné kyseliny), a nebo se měří intenzita (pH).

Hodnota pH se vyjadřuje jako záporný dekadický logaritmus vodíkových kationtů v moštu nebo víně. Stanovuje se měřením potenciálu skleněné elektrody, který závisí na aktivitě vodíkových kationtů, vzhledem k referenční kalomelové elektrodě vhodným milivoltmetrem (pH – metrem), kalibrovaným tlumivými roztoky o známém pH.

Postup: Nejdřív se udělá příprava tlumivých roztoků a kalibrace pH – metru při teplotě laboratoře dle typu přístroje a instrukcí výrobce. Ve 20 – 50 ml vína o teplotě

laboratoře se změří hodnota pH po ustálení hodnoty na digitální stupnici s přesností na dvě desetinná místa (BALÍK, 1998).

5.7.3 Stanovení těkavých kyselin (EEC No 2676/90)

Těkavé kyseliny jsou produkovány přítomnými mastnými kyselinami, zejména kyselinou octovou, jež se vyskytují ve víně volně ve formě solí.

Těkavé kyseliny se zjistí titrací destilátu získaného destilací vína s vodní parou roztokem louhu. Oxid uhličitý se z vína odstraní před destilací. Obsah stanovených kyselin v destilátu se sníží o spotřebu louhu na neutralizaci volného a vázaného oxidu siřičitého v destilátu. V případě že testované víno obsahuje kyselinu sorbovou, je třeba její koncentraci určit jinou metodou a odečíst od určeného obsahu těkavých kyselin (100 mg kyseliny sorbové se rovná 0,89 miliekvivalentům nebo 0,053 g kyseliny octové).

5.7.4 Stanovení těkavých kyselin ve vzorku vína:

Oxid uhličitý odstraníme stálým třepáním asi z 50 ml testovaného vína v odsávací baňce, která je zapojená na vodní vývěvu. Do destilační baňky musíme odpipetovat 20 ml vína bez oxidu uhličitého. Přidáme asi 0,5 g kyseliny vinné, zapojíme destilační aparaturu a destilát zachytáváme do 500 ml kádinky. Získaných 250 ml destilátu titrujeme 0,1 mol/l roztokem NaOH na dvě kapky roztoku fenoftaleinu do trvalého slabého růžového zbarvení. Dodáme čtyři kapky zředěné kyseliny chlorovodíkové, 2 ml škrobového mazu, několik krystalů jodidu draselného a titrujeme volný oxid siřičitý 0,01 mol/l roztokem jódu do modrého zbarvení.

Postupně přidáváme nasycený roztok $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ do znovuobjevení růžového zbarvení a titrujeme vázaný oxid siřičitý 0,01 mol/l roztokem jódu do modrého zbarvení.

5.7.5 Stanovení kyseliny jablečné enzymaticky UV – metodou

Stanovení L-malátu se obecně uskutečňuje přímo ve víně, tedy bez předchozího odstranění zbarvení a také bez zředění, jestliže obsah kyseliny L-jablečné je menší než

350 mg/l. Pakliže tomu tak není, zředí se víno dvakrát destilovanou vodou, dokud obsah L-malátu není mezi 30 a 350 mg/l.

Jestliže je obsah malátu ve víně menší než 30 mg/l, objem zkušební vzorku se může zvýšit až na 1 ml. V takovém případě se objem přidávané vody sníží tak, aby celkové objemy v obou kyvetách byly stejné.

Spetrofotometrem nastaveným na vlnovou délku 340 nm se stanoví absorbance pomocí kyvet o optické dráze 1 cm, přičemž se použije vzduch jako (referenční) standard nulové absorbance. (HLOŽKOVÁ, 2008)

5.7.6 Stanovení kyseliny mléčné

Kyselina mléčná je produktem malolaktické fermentace. Ve víně se stanovuje jodometricky. Kyselina mléčná reaguje s manganistanem draselným za vzniku acetaldehydu, který se po oddestilování váže v předloze na siřičitan. Vzniká aldehyd-siřičitanový komplex, jež se působením hydrogenuhličitanu sodného rozkládá. Uvolněný oxid siřičitý se určí jodometricky. (HOLOŽKOVÁ, 2008)

5.7.7 Stanovení kyseliny vinné podle Rebeleina

Kyselina vinná tvoří s metavanadičnanem amonným barevný komplex měřitelný spektrofotometricky při 530 nm.

Za pomoci standardního roztoku kyseliny vinné a destilované vody nachystáme řadu 100 ml odměrných baněk o koncentracích 1, 2, 3, 4, 5 g/l kyseliny vinné.

Přichystáme sedm suchých 200 ml kónických baněk s 25 ml roztoku A. Do prvních pěti odměříme po 5 ml z připravených 100 ml odměrných baněk standardů. Do šesté pipety odměříme 5 ml testovaného vína a přidáme 1-1,5 g aktivního uhlí. Šestou kónickou baňku protřepeme a filtrujeme. Do sedmé kónické baňky odměříme 5 ml destilované vody.

Pipetou odměříme z kónických baněk a filtrátu po 10 ml do označených 100 ml odměrných baněk. Do všech 100 ml odměrných baněk za stálého míchání přidáme 5 ml roztoku B a doplníme po značku destilovanou vodou. Hodnoty měříme po uplynutí 10 minut absorbcí roztoků pomocí VIS-spectrofotometru v 10 mm kyvetě proti slepému pokusu (roztok bez kyseliny vinné) při 530 nm. (BALÍK, 1998)

5.8 Stanovení volatilních látek ve víně

Během 19. století byla pozornost upřena na stanovení hlavních látek nacházejících se ve víně, jako jsou etanol, cukry a organické kyseliny. Moderní trendy jsou více zaměřeny na pokročilé analytické přístroje pro detailnější a rychlejší analýzu. Ta se vztahuje na komplexní kvantitativní a kvalitativní rozbor všech přítomných látek, které jsou produkovány v důsledku chemických a biochemických procesů při vinifikaci.

Pro kvantifikaci těkavých sloučenin se používá řada technik. Hlavním úkolem kvantitativní analýzy je rozdělit sloučeninu na určité látky nebo stanovit čistou látku. Využívá se specifických reakcí v jednotlivých surovinách, materiálech, výrobcích apod. A také reakcí, které se konají jednoznačně bez vzniku vedlejších produktů.

Základem kvantitativní analýzy jsou metody termické, elektrochemické, optické, absorpčně-spektrální, radiometrické, elektromagnetické, plynové a papírové chromatografie a metody hmotnostní spektrometrie. Vhodnost metody pro daný druh sloučeniny souvisí s chemickým složením suroviny. Při sledování složitých biochemických procesů výroby vína se vychází z výsledků moderních analytických metod, které poskytují podrobné údaje chemického složení vína.

Rozmanitost vůně vína se odvíjí od mnoha faktorů a je ovlivněna různými biologickými procesy. Na smyslové vnímání působí široká škála těkavých sloučenin a informace o jejich senzorických vlastnostech je základem pro pochopení faktorů ovlivňujících aromatu vína vlivem MLF.

V dnešní době si nelze představit hodnocení kvality hroznů, moštů a vína bez objektivní a podrobné chemické analýzy. Poznatky z chemického rozboru jsou důležité pro optimální zralost hroznů, vinifikaci a kontrolu kvality vína. Můžeme včas zasahovat do vlastní technologie a předcházet různým nepříjemným vlivům. V dnešní době je velký zájem o metody s vysokou propustností a rychlou kvantifikací. Je to z důvodu chemického projevu smyslových vjemů a pozorování kvalitativních změn ve složení volatilních látek v důsledku vinařské technologie, vinohradnických postupů a vývoji skladování. (MINÁRIK ET AL., 1970)

5.9 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je jednou z nejrozšířenějších analytických metod umožňující efektivní separaci látek, která je nutná pro spolehlivou kvantifikaci a identifikaci složek sledovaného vzorku. Tato separační a analytická metoda má výsadní pozici v analýze těkavých látek. Jednou z hlavních výhod je rychlé a jednoduché provedení analýzy, malé množství vzorku a účinná separace látek. Tato technika je vhodná pro stanovení a dělení plynů, kapalina a také pevných látek s bodem varu do 400 °C.

Plynová chromatografie upřednostňuje plynné látky a také kapalné, které se dají odpařit. Využívá různé rychlosti unášení látek v prostředí. V praxi se využívá více variant, ale nejrozšířenější jsou plynové chromatografy s kapilárními kolonami. Jejich principem je průchod mobilní fáze přes kolonu. Aby se dosáhlo nejlepšího rozdělení látek v koloně, musí být průtok mobilní fáze správně optimalizován. Zde je mobilní fází interní plyn (vodík, dusík, helium apod.). Pro volbu nosného plynu jsou zohledněny následující faktory: čistota, účinnost, viskozita, reaktivita, cena plynu a typ používaného plynu.

Plynovou chromatografii dělíme na systém *plyn – pevná látka* (GSC) a *plyn – kapalina* (GLC). U GSC je transport analytu mezi mobilní a stacionární fází založen na absorpci, ale nevýhoda spočívá v úzké oblasti linearit absorpční isotermy. V případě GLC dochází k rozpuštění látky v obou fázích. Aby byla kapalná fáze v koloně ukotvena, musí být chemicky stabilní i při vysoké pracovní teplotě a měla by mít nízkou tenzi par. Jedná se o vysoko vroucí kapalinu, která je nanosená v tenké vrstvě na pevném interním nosiči. Jako kapalná stacionární fáze jsou v GLC často používány např. polyestery, polysiloxany nebo polyetglynglykoly. (LITERÁK, 2009)

5.10 GC-MS stanovení jednotlivých volatilních sloučenin

Z 12 vzorků vína zpracováním 3 modrých odrůd révy vinné byly uvolněny látky, které se následně analyzovaly metodou GC-MS plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Celkem bylo identifikováno a kvantifikováno 60 aromatických sloučenin. Z nich bylo vybráno 16 sloučenin, které ovlivňují aroma při MLF

a vykazovaly největší rozdíly v hodnotách. Dále byly porovnány se standardy a zpracovány do tabulky.

5.10.1 Příprava vzorku

Koncentrace jednotlivých volatilních látek ve víně byla zjištěna doposud nepublikovanou metodou extrakce methyl-t-butyletherem. Do 25ml odměrné baňky bylo odpipetováno 20 ml vína, 50 μ l roztoku 2-nonanolu (500mg/l) a cyklopentanonu (25g/l) v ethanolu. Ten byl dán jako vnitřní standard a 5 ml nasyceného roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Následně byla baňka důkladně promíchána a bylo dodáno 0,75 ml extrakčního rozpouštědla, tím bylo MTBE s přídavkem 1% neohexanu. Po následném protřepání a oddělení fází, byla vrchní organická vrstva i s podílem vzniklé emulze odebrána do mikrozkušavky. Odstředěna a čirá organická fáze byla vysušena bezvodým síranem hořečnatým. Tímto způsobem upravený extrakt byl dále použit k GC-MS analýze.

5.10.2 Chemikálie

Chemikáliemi pro GC byly Methyl t-butyl ether (MTBE) a cyklohexan.

Ostatní použité chemikálie byly p.a. kvality od lokálního dodavatelů (Lachema, Penta).

V tabulce 7 uvedené látky pocházely od Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) a byly použity jako standardy.

Tab. 7 Standardy pro GC-MS analýzu

Ethyl acetát	Ethyl oktanoát	Nerol
Methanol	Kyselina octová	2-Phenylethyl acetát
Diacetyl	Furfural	Beta-Damascenon
Isobutyl acetát	2-Nonanol	Hexanová kys.
Ethyl butyrát	Propionová kys.	Geraniol
1-Propanol	2,3-Butandiol	Benzylalkohol
1-Butylacetát	Linalool	2-Phenylethanol
Hexanal	Isomáselná kys.	Beta-Ionon
Isobutylalkohol	Gama-butyrolakton	4-Ethylguaiacol
Isoamyl acetát	Máselná kys.	Furaneol
1-Butanol	Beta-Terpineol	Diethylmalát
Isoamylalkohol	Ethyl dekanoát	Oktanová kys.
(E)-2-Hexenal	Furfurylalkohol	4-Ethylfenol
Ethyl hexanoát	Isovalerová kys.	4-Vinylguaiacol
1-Hexyl acetát	2-Methylbutanová kys.	2-Aminoacetophenon
Acetoin	Diethyl sukcinát	Methyl antranilát
Ethyl laktát	Alfa-Terpineol	Dekanová kys.
1-Hexanol	Methionol	4-Vinylfenol
(E)-2-Hexen-1-ol	Beta-Citronellol	Dodekanová kys.

5.11 GC-MS Analýza

Plynový chromatograf GC-17A je analytický přístroj, který měří různý obsah složek ve vzorku. Jedná se o digitálně řízený přístroj, kde se metodické parametry nastavují klávesnicí pomocí řízeného softwaru. Roztok se vstříkuje do přístroje pod proudem plynu, který ho přepravuje do separační baňky. Jako nosný plyn se používá helium nebo dusík. Jednotlivé složky jsou od sebe separovány uvnitř kolony. Detektor měří množství komponentů, které opouští kolonu. Pro měření vzorku s neznámou koncentrací se používá standardní vzorek o známé koncentraci, který se vstříkuje do přístroje. U standardního vzorku jsou píky retenční k času a plochy píku jsou porovnávány se zkušebním vzorkem pro výpočet koncentrace.

Příklad analýzy:

Instrumentace: Shimadzu GC-17A

Autosampler: AOC - 5000

Detektor: QP-5050A

Software: GCsolution

Podmínky separace:

Kolona: DB-WAX 30m x 0,25mm; 0,25 μ m stacionární fáze (polyethylenglykol)

Objem nástřiku vzorku: 1 μ l split poměr 1:5

Průtok nosného plynu He: 1 ml/min (lineární rychlost plynu 36 cm/s)

Teplota nástřikového prostoru: 180°C

Počáteční teplota kolonového prostoru 45°C byla udržována 3,5 minuty, poté následoval gradient teploty:

do 90°C o 12°C/min drženo 0,75min

do 120°C o 3°C/min

do 252°C o 6°C/min. Konečná teplota byla držena 5 min.

Celková délka analýzy byla 45 minut.

Detektor pracoval ve SCAN modu s intervalem 0,25 s v rozmezí 14-264.

Napětí detektoru 1,5 kV.

Jednotlivé látky byly identifikovány na základě MS spektra a retenčního času.

Kvantifikace byla vykonána srovnáním plochy píku vzorku a vnějšího standardu s korekcí na vnitřní standard.

6 Výsledky práce

Výsledky práce popisují chemickou analýzu, senzoričké hodnocení a statistickou analýzu.

6.1 Chemická analýza

Chemická analýza popisuje rozbor moštu, vína a volatilních látek.

V tabulce 8 jsou výsledky analýzy moštu.

Tab. 8 Rozbor moštu

Odrůda	André	Cabernet Moravia	Frankovka
Cukernatost (°NM)	19	18	18
pH	3,19	3,44	3,34
Titrovatelné kyseliny (g.l ⁻¹)	8,5	7,2	7,5
Těkavé kyseliny (g.l ⁻¹)	0,14	0,16	0,13
Kyselina jablečná (g.l ⁻¹)	4,2	3,6	3,4
Kyselina mléčná (g.l ⁻¹)	0	0	0
Kyselina vinná (g.l ⁻¹)	6,5	5,4	7,3

Z tabulky je zřejmé, že nejvyšší cukernatosti při sběru dosáhlo André (An) 19°NM a o stupeň méně dosáhla Cabernet Moravia (CM) a Frankovka (Fr).

Pro optimální průběh MLF jsou udávány hodnoty pH v rozmezí 3,1 – 3,5. Všechny tři vína tyto parametry splňují, a proto nastartování MLF proběhlo bez problémů. Nejnižší pH bylo naměřeno u André a nejvyšší u Cabernet Moravie, což koresponduje také s obsahem titrovatelných kyselin, kdy u An byla naměřena hodnota 8,5 g/l a u CM 7,2 g/l.

Kyselina mléčná vykazuje nulové hodnoty, což odpovídá tomu, že MLF ještě nezačala probíhat. Kyselina jablečná vykazuje nejvyšší hodnoty u An a to 4,2 g/l a nejnižší u Fr 3,4 g/l. Podle Steidla obsahují vyzrálé hrozny 3 – 5 g/l kyseliny jablečné. Obsah kyseliny vinné je nejvyšší u Fr 7,3 g/l a nejnižší u CM 5,4 g/l. V moštích vyzrálých hroznů je podíl kyseliny vinné 65 – 70 % všech titrovatelných kyselin. (STEIDL, 2002)

Obsah těkavých kyselin je poměrně nízký a nejnižší hodnoty vykazuje Fr 0,13 g/l a nejvyšší CM 0,16 g/l.

6.2 Rozbor vína po MLF

Rozbor vína naznačuje hodnoty po provedení MLF. Následující tabulka 9 popisuje rozbor kyselin, alkoholu a pH ve víně.

Tab. 9 Rozbor vína po MLF

	Alkohol	Titř kys.	pH	Jablečná	Mléčná	Octová	Vinná
	%	g/l		g/l	g/l	g/l	g/l
Fr-bez MLF	12,91	7,88	3,14	2,03	0,74	0,56	2,98
Fr-spon MLF	12,54	6,81	3,23	0,12	1,87	0,51	3,08
Fr-do kvasu	11,45	6,44	3,16	0,06	1,79	0,53	3,15
Fr-po kvasu	12,53	6,59	3,19	0,02	1,75	0,55	3,11
An-bez MLF	13,04	7,91	3,18	2,60	0,04	0,57	3,57
An-spon MLF	13,02	7,23	3,28	0,90	1,40	0,60	3,34
An-do kvasu	12,41	6,88	3,18	0,08	1,88	0,56	3,55
An-po kvasu	12,75	6,52	3,26	0,00	2,17	0,64	3,09
CM-bez MLF	12,58	6,58	3,33	2,62	0,21	0,69	1,63
CM-spon MLF	12,56	5,55	3,45	0,12	2,09	0,70	2,04
CM-do kvasu	13,20	5,62	3,45	0,17	2,06	0,69	1,98
CM-po kvasu	12,60	5,60	3,43	0,11	2,28	0,70	1,86

Výsledky rozboru vína naznačují, že nejlépe odbourala vína, do nichž byly MB přidány po průběhu MLF, kde An přeměnila kyselinu jablečnou na mléčnou úplně a u Fr a CM zůstal nepatrný zbytek. Nejvíce kyseliny jablečné zůstalo ve vzorku An spontánní MLF. U vín kde MLF nebyla provedena, nepatrná část kyseliny jablečné odbourala na konci AF. Nejvíce kyseliny octové narostlo u vzorků CM a nejméně Fr.

6.3 GC-MS analýza

Vybrané sloučeniny byly zpracovány do tabulek a grafů a následně popsány.

V tabulce 10 jsou uvedeny GC-MS analýzy.

Tab. 10 Výsledky GC – MS analýzy vybraných volatilních látek vyšších alkoholů, těkavých mastných kyselin a těkavých fenolů

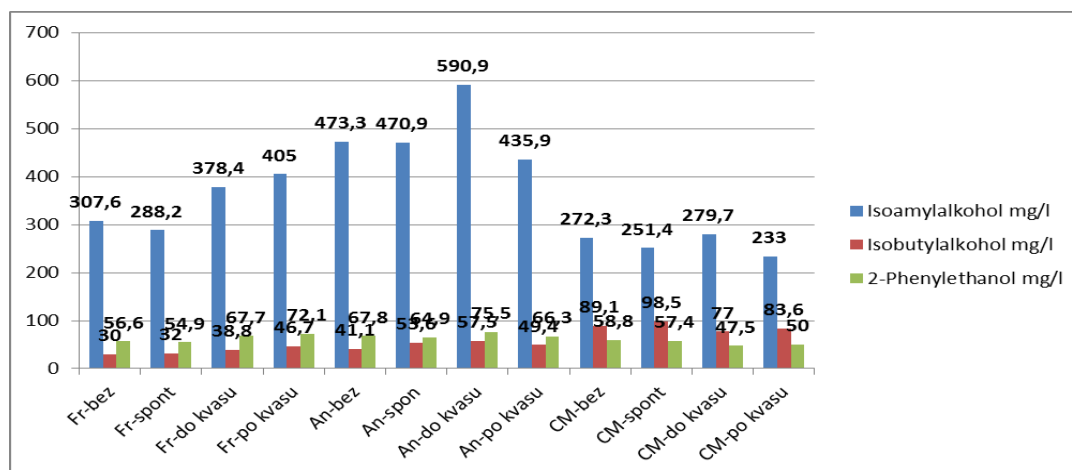
	Isoamyl- alkohol	Isobutyl- alkohol	2-Fenyl- ethanol	Isomáselná kys.	Isovalerová kys.	4- Ethylguaiacol	4- Ethylfenol
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	µg/l	µg/l
Fr- bez	307,6	30	56,6	2,29	1,59	9	10
Fr- spont	288,2	32	54,9	2,89	2,07	10	6
Fr-do kvasu	378,4	38,8	67,7	2,53	1,78	3	1
Fr-po kvasu	405	46,7	72,1	2,7	1,8	6	5
An- bez	473,3	41,1	67,8	2,33	1,39	0	6
An- spon	470,9	53,6	64,9	2,31	1,23	3	9
An-do kvasu	590,9	57,5	75,5	2,52	1,46	11	26
An-po kvasu	435,9	49,4	66,3	2,47	1,36	6	10
CM- bez	272,3	89,1	58,8	3,3	0,58	0	3
CM- spont	251,4	98,5	57,4	3,21	0,46	0	3
CM- do kvasu	279,7	77	47,5	3,53	0,76	4	5
CM- po kvasu	233	83,6	50	3,82	0,58	0	6

Pro hodnocení byly vybrány tři vyšší alkoholy. Jedná se Isoamylalkohol, který při koncentraci nad 500 mg/l může dávat vínu agresivní vůni rozpouštědla, připáleniny a likérovosti. Naproti tomu při koncentracích pod 300 mg/l přispívají k rozmanitosti ovocných vůní. Další sloučeninou je Isobutylalkohol, který při koncentraci vyšší než 50 mg/l může způsobovat hořkost ve víně. Poslední hodnocenou sloučeninou byl 2-Fenylethanol. Ten přidává do vína kořenitost. Práh vnímání je 10-14 mg/l.

V tabulce jsou dále uvedeni dva zástupci těkavých mastných kyselin. Isomáselná kyselina má práh vnímání 2,3 mg/l a při vysokých koncentracích je zodpovědná za žluklost, máselnou a sýrovou pachut'. Kyselina isovalerová má percepci 3,3 mg/l a vysokých koncentracích přidává do vína aroma potu a kyselost.

Posledními zástupci jsou v tabulce těkavé fenoly. Sloučeniny 4-Ethylguaiacol a 4-Ethylfenol v malém množství podporují aroma po hřebíčku a kouři. Při vyšších koncentracích zanechávají vůně po dehtu a špeku.

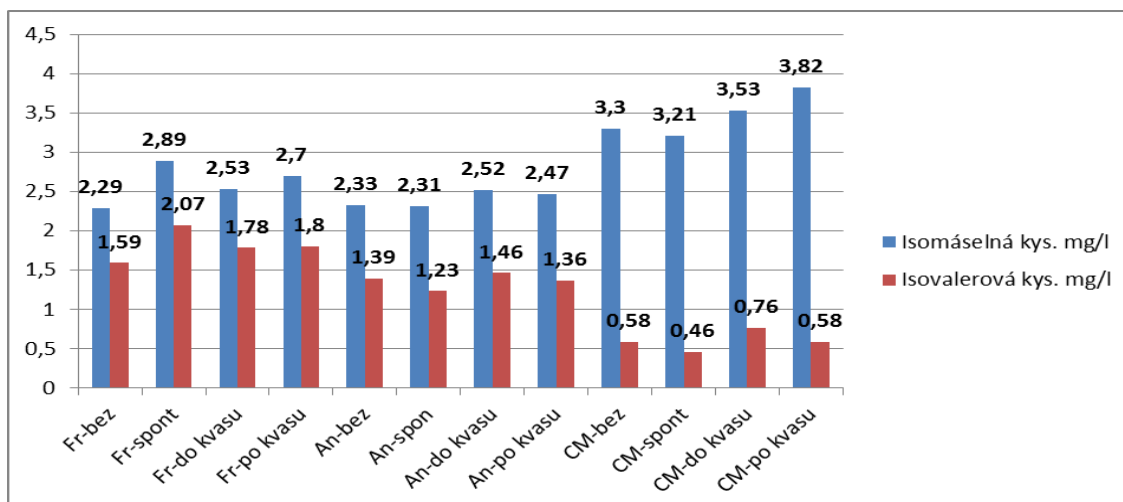
Graf 1 znázorňuje obsah vyšších alkoholů ve víně.



Graf 1 Obsah vyšších alkoholů ve víně

Grafické znázornění ukazuje, že nejvyšší hodnoty isoamylalkoholu vykazuje odrůda André a vzorek An po kvasu překračuje mez 500 mg/l a to znamená výskyt pavůni rozpouštědla, likérovosti a připáleniny. Sensorická analýza to, ale nepotvrdila. Isobutylalcohol vykazoval poměrně normální hodnoty. Nejvyšší koncentrace byla u CM spontánní MLF. Sloučenina 2-Phenylethanol neznázorňovala větší rozdíly a nejvyšší obsah byl u vzorku An do kvasu.

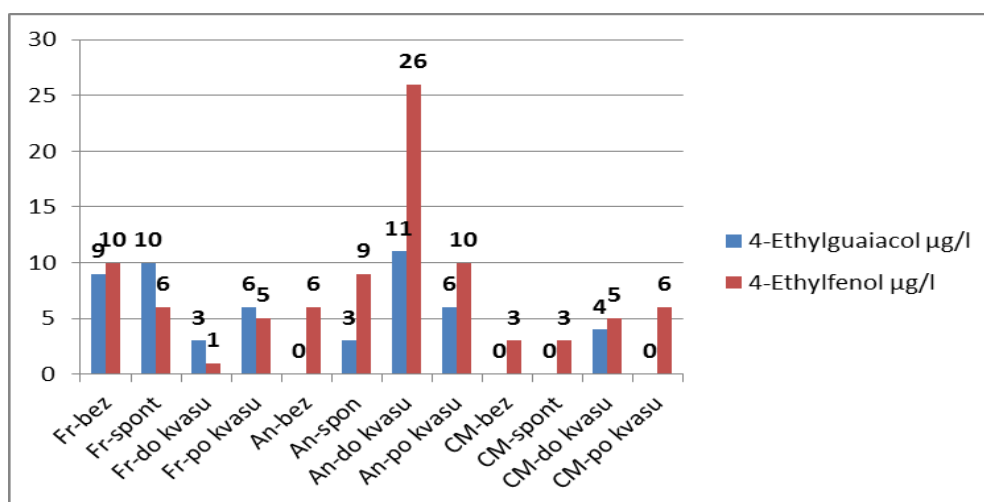
V grafu 2 je znázorněn obsah těkavých mastných kyselin ve víně.



Graf 2 Obsah těkavých mastných kyselin ve víně

Grafické znázornění naznačuje, že nejvyšší koncentraci isomásečné kyseliny obsahovala vína odrůdy Cabernet Moravia, ale její množství nebylo nikterak vysoké. Nejvyšší hodnoty vykazovala CM po kvasu a nejnižší Fr bez MLF. Naopak odrůda Cabernet Moravia obsahovala nejméně isovalerové kyseliny. Největší koncentraci vykazovala Fr spontánní MLF, což bylo hodnoceno také degustátory při sensorické analýze.

V grafu 3 je vidět, že hodnoty těkavých fenolů nejsou nikterak vysoké.



Graf 3 Obsah těkavých fenolů ve víně

Nejvyšší hodnoty 4-Ethylguaiacolu a 4-Ethylfenolu vykazoval vzorek An do kvasu, což může znamenat lehké zvýšení kořenitosti a živočišnosti, ale to degustátoři

nepotvrdili. Nulové hodnoty 4-Ethylguaiacolu vykazovaly tři vzorky Cabernet Moravie a An bez MLF.

V tabulce 11 jsou znázorněny výsledky GC-MS analýzy vybraných volatilních látek esterů, sirných a acetoainových sloučenin.

Tab. 11 Výsledky GC – MS analýzy vybraných volatilních látek esterů, sirných sloučenin a acetoainových sloučenin

	Ethyl acetát	Ethyl oktanoát	Ethyl dekanoát	Ethyl laktát	Diethyl sukcinát	Methionol	2-Methyltetra-thiophen-3-on	Diacetyl	Acetoin
	mg/l	µg/l	µg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
Fr-bez	58,3	125	24	10,35	0,52	4,55	0	0	0
Fr-spont	59,9	152	24	85,76	3,88	7,29	0,27	3,2	1,6
Fr-do kvasu	50,2	143	21	108,3	0,48	6,08	0,17	2,1	1,3
Fr-po kvasu	56,9	148	21	87,41	2,68	7,88	0,27	6	2,7
An-bez	65,3	133	30	40,5	1,57	4,47	0,1	4,9	3,7
An-spon	78,2	125	20	62,59	2,58	4,78	0,18	8,3	9,1
An-do kvasu	66,4	3550	23	117,91	1,57	5,76	0,23	6	23,5
An-po kvasu	86	127	25	123,81	6,31	4,92	0,08	3,5	7,7
CM-bez	88	62	12	13,35	0,64	2,82	0	0	3,2
CM-spont	101,5	56	9	76,98	3,65	2,31	0	16,2	5,7
CM-do kvasu	109	99	20	82,83	3,15	1,91	0	13,9	6,5
CM-po kvasu	100,8	61	7	89,27	4,37	2,63	0	12,8	6,4

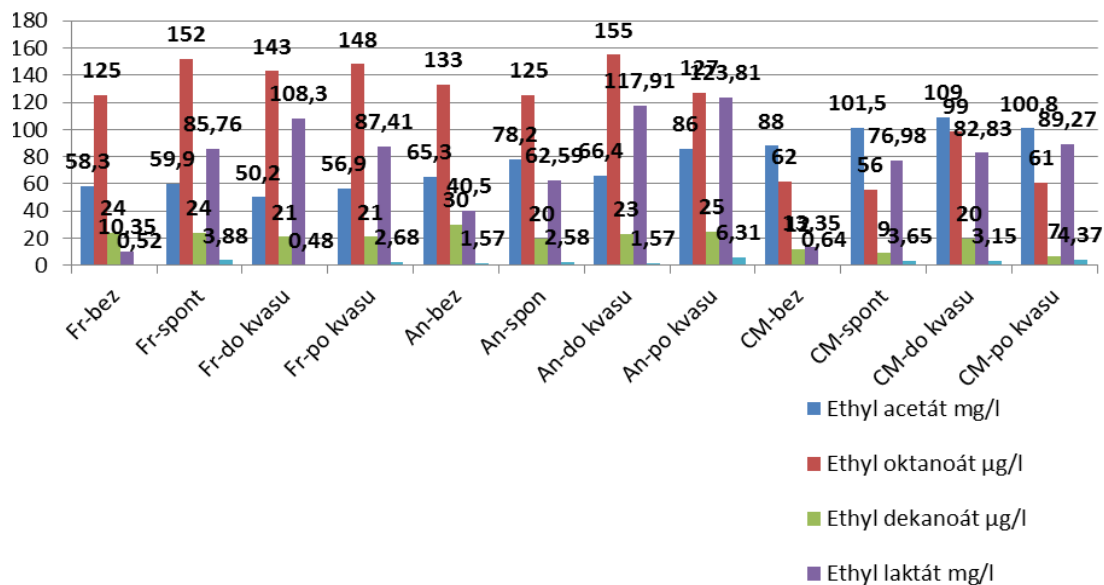
Pro hodnocení bylo vybráno 5 esterů. Nejdůležitější estery, které jsou produkovány při MLF jsou diethyl sukcinát a ethyl laktát. Diethyl sukcinát stojí za širokou škálou ovocných aroma a jeho prahová detekce je 1,2 mg/l. Ethyl laktát je velmi významná sloučenina vzhledem k jeho ovocným, krémovým a máslovým vůním. Jeho prahová detekce je 110 mg/l. Vína, u nichž neproběhla MLF mají koncentraci 5-10 mg/l a u vín s úspěšně provedenou MLF je obsah 90 – 150 mg/l. Další estery také přispívají do širokého spektra ovocných vůní. Ethyl acetát patří také k významným esterům. Jeho práh vnímání se pohybuje okolo 120 mg/l. Největší koncentrace se vyskytují v mladých vínech. Při nižších koncentracích přispívá k ovocnosti a při vyšších může působit jako

odlakovač. Ve víně se obvykle vyskytuje v koncentraci 11 – 261. Ethyl dekanoát dává vínu hroznové aroma a ethyl oktanoát sladce ovocné aroma.

V tabulce jsou vybrány 2 sirné sloučeniny, které velmi výrazně ovlivňují aromatický profil červeného vína. Methionol se řadí mezi látky, které jsou spojovány s redukční pachutí. Je zodpovědný za aroma po vařených bramborách vařené zelenině. Travnatými a herbálními tóny je charakteristický 2-metyltetrathiophen-3-on.

Nejdůležitějšími látkami produkované při MLF je diacetyl a acetoin. Sensorický práh vnímání je nízký (0,2-2,3 mg/l). V množství 1 – 4 mg/l přispívá ke krémovým aroma vína a je hodnocen velmi pozitivně. Hodnota nad 7 mg/l je považována za velmi nežádoucí a může se jednat o aroma zkaženého zelí a silné tóny zakyslé smetany. Acetoin má velmi vysoký práh vnímání 150 – 600 mg/l a proto aroma vína nějak zvlášť neovlivňuje.

V grafu 4 je znázorněn obsah esterů ve víně.

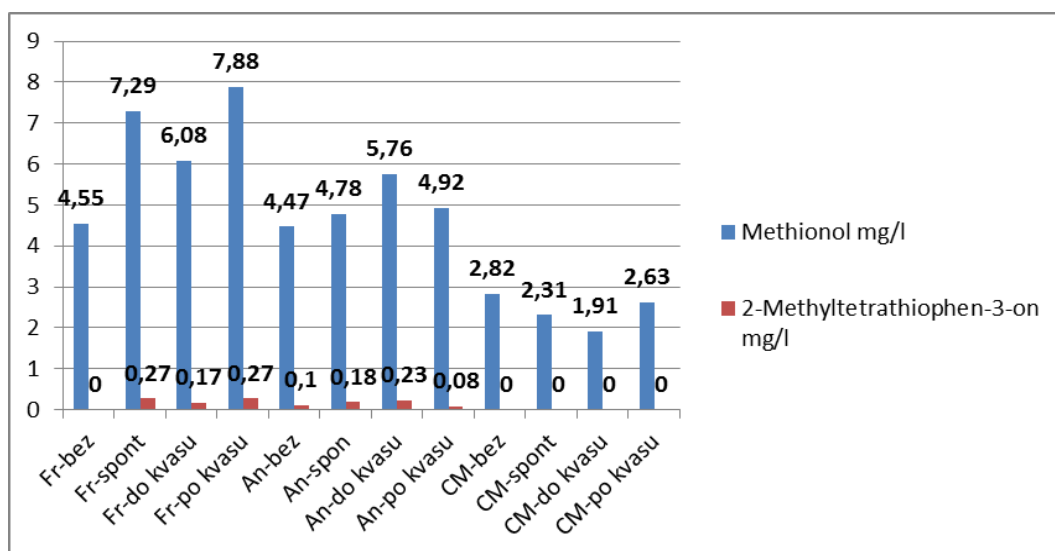


Graf 4 Obsah esterů ve víně

Z grafu 4 je zřetelné, že nejvyšší hodnoty má diethyl sukcinát u An po kvasu, což by mohlo stát za vysokým hodnocením tohoto vína degustátory. Naopak nejnižší hodnoty byly u Fr do kvasu a Fr bez MLF. Ethyl laktát měl nejvyšší hodnoty rovněž u An po kvasu a dále u An do kvasu. Nejnižší hodnoty obsahovala vína, u kterých neproběhla MLF, i když je vidět, že na konci AF bylo část kyseliny jablečné odbouráno

i u An bez MLF. Ethyl acetát se vyskytova poměrně v malých koncentracích. Největší obsah byl CM do kvasu a CM spontánní MLF. Nejnižší byl Fr do kvasu. U ethyl oktanoátu byla největší koncentrace u An do kvasu a u ethyl dekanoátu byla u An po kvasu a nejnižší u CM po kvasu.

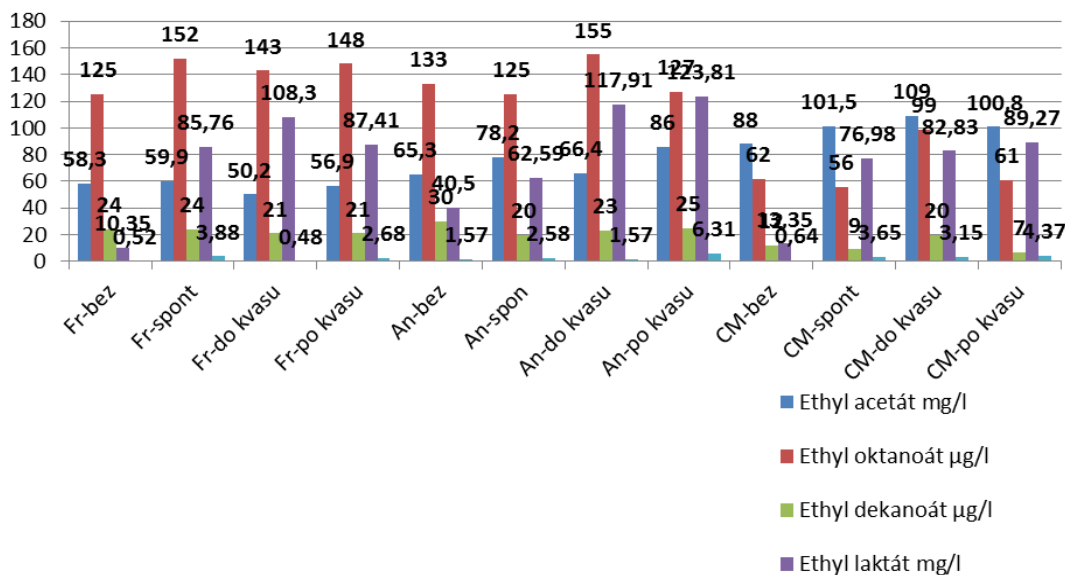
V grafu 5 je znázorněn obsah sirných sloučenin ve víně.



Graf 5 Obsah sirných sloučenin ve víně

Grafické znázornění ukazuje, že methionol se vyskytuje v nejvyšší koncentraci ve Fr po kvasu u Fr spontánní, u níž to rozpoznali také hodnotitelé. Nejnižší zase u CM do kvasu. U 2-Methyltetrahydrothiophen-3-onu se nejvyšší koncentrace vyskytuje u vzorků Fr spontánní a Fr po kvasu. U Cabernet Moravie se tato sloučenina vůbec neobjevila.

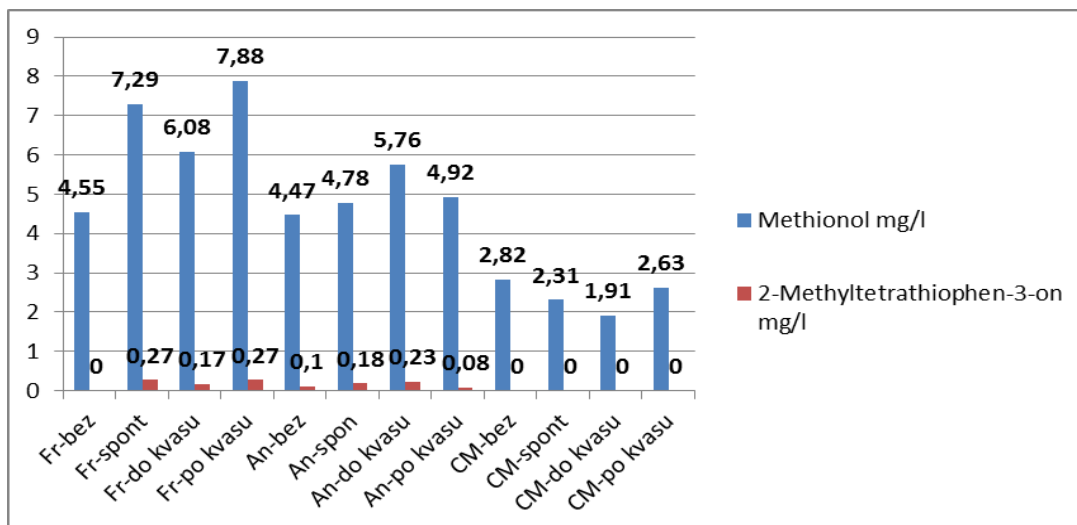
V grafu 6 je znázorněn obsah esterů ve víně.



Graf 6 Obsah esterů ve víně

Z grafu 6 je zřetelné, že nejvyšší hodnoty má diethyl sukcinát u An po kvasu, což by mohlo stát za vysokým hodnocením tohoto vína degustátory. Naopak nejnižší hodnoty byly u Fr do kvasu a Fr bez MLF. Ethyl laktát měl nejvyšší hodnoty rovněž u An po kvasu a dále u An do kvasu. Nejnižší hodnoty obsahovala vína, u kterých neproběhla MLF, i když je vidět, že na konci AF bylo část kyseliny jablečné odbouráno i u An bez MLF. Ethyl acetát se vyskytova poměrně v malých koncentracích. Největší obsah byl CM do kvasu a CM spontánní MLF. Nejnižší byl Fr do kvasu. U ethyl oktanoátu byla největší koncentrace u An do kvasu a u ethyl dekanooátu byla u An po kvasu a nejnižší u CM po kvasu.

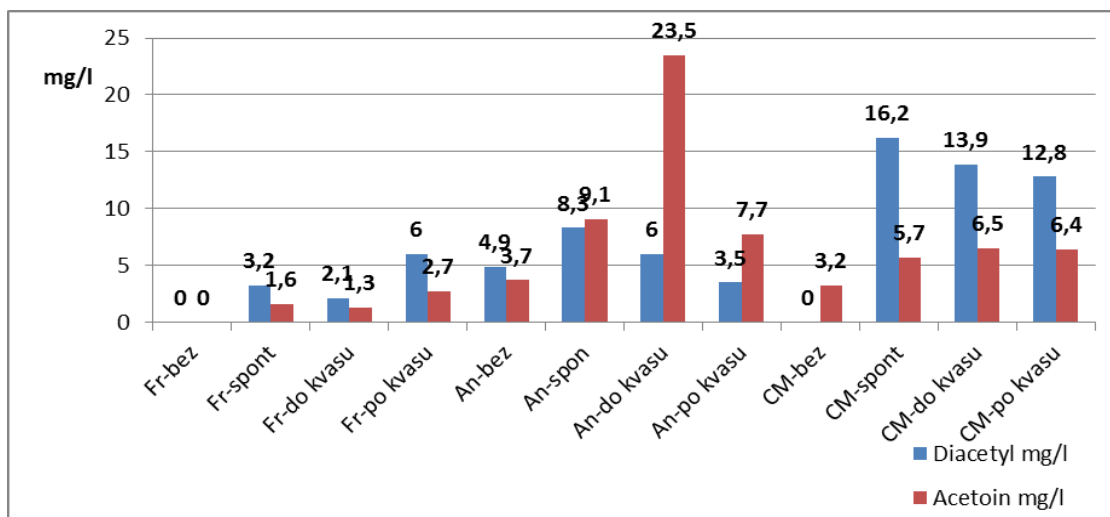
V grafu 7 je znázorněn obsah sirmých sloučenin.



Graf 7 Obsah sírných sloučenin ve víně

Grafické znázornění ukazuje, že methionol se vyskytuje v nejvyšší koncentraci ve Fr po kvasu u Fr spontánní, u níž to rozpoznali také hodnotitelé. Nejnižší zase u CM do kvasu. U 2-Methyltetrahydrothiophen-3-onu se nejvyšší koncentrace vyskytuje u vzorků Fr spontánní a Fr po kvasu. U Cabernet Moravie se tato sloučenina vůbec neobjevila.

Na grafu 8 je obsah acetoinových sloučenin ve víně.



Graf 8 Obsah acetoinových sloučenin ve víně

V grafu 8 lze vidět, že nejvíce diacetylu bylo vyprodukováno CM, kde byla nastartovaná MLF. Nevyšší koncentraci vykazovala CM spontánní MLF, což bylo hodnoceno také degustátory. Tento vzorek skoro trojnásobně překračoval limit a bylo to při senzoričké analýze hodnoceno, jako silný jogurtový tón až vůně zakysané smetany.

Zbylé dva vzorky vykazovaly o něco menší koncentrace diacetylu. Nulové množství měla Fr a CM bez MLF. Hodnotu 4,9 mg/l obsahoval vzorek An bez MLF, což lze přisoudit částečně provedené MLF na konci AF nebo kvasinkám, které jsou také schopně tvořit diacetyl. Nejvyšší hodnoty acetoinu měl vzorek An do kvasu, ale toto množství bylo zanedbatelné oproti prahové citlivosti. Nulovou hodnotu měl vzorek Fr bez MLF.

6.4 Senzorické hodnocení

Senzorické hodnocení vín bylo provedeno ve sklepních prostorách Vinařství Veselý v Moravském Žižkově dne 28. 4 2015. Degustace se zúčastnili 4 degustátoři s platným osvědčením o degustátorské zkoušce. Bylo podáno celkem 12 vzorků červených vín. Z toho 4 vína byly z odrůdy André, 4 vína z odrůdy Frankovka a 4 vína z odrůdy Cabernet Moravia. Z každé odrůdy se hodnotil 1 vzorek, ve kterém MLF neproběhla a u dalších se hodnotily 3 různé varianty provedení MLF. K bodovému hodnocení byl použit 100 bodový systém. Dále měl každý degustátor za úkol ohodnotit vína pomocí úsečky k zaznamenávání senzorických hodnot. Z výsledků byl vypočten aritmetický průměr. Výsledky byly zpracovány do tabulek a grafů.

V tabulce 12 jsou znázorněny výsledky senzorického hodnocení 100 bodovým systémem.

Tab. 12 Výsledky senzorického hodnocení 100 bodovým systémem

Odrůda a způsob MLF	Průměrné hodnocení	Směrodatná odchylka
An – bez MLF	73,25	2,95
An – spontánní MLF	82,25	1,8
An – bakterie do kvasu	79,25	3,7
An – bakterie po kvasu	84,5	1,5
Fr – bez MLF	77,25	3
Fr – spontánní MLF	73,25	3,1
Fr – bakterie do kvasu	80,75	3,5
Fr – bakterie po kvasu	82	2,2
CM – bez MLF	80,5	2,1
CM – spontánní MLF	69,5	3,6
CM – bakterie do kvasu	76,5	4,4
CM – bakterie po kvasu	78,75	3,8

Výše uvedená tabulka ukazuje sensorické hodnocení pokusu. Degustátoři nejlépe hodnotili vzorek André, u kterého byly přidány MB po ukončení AF. Druhé místo získalo opět André, u kterého proběhla MLF spontánně. A třetí místo v počtu nejvíce obdržených bodů získala Frankovka, do které byly bakterie také přidány po AF. Na nejméně bodů ze všech hodnocených vín dosáhla Cabernet Moravia se spontánní MLF.

6.4.1 Sensorické hodnocení vín podle úseček

Napomáhá k sensorickému doplnění hodnot vín. Podle KYSELÁKOVÁ ET AL. (2003) měří úsečka 10 cm a nejmenší hodnotou je 0 a největší 10. Další hodnoty odpovídají centimetrům, které se převedou na body. Hodnocena byla intenzita aroma, typičnost odrůdového aroma, ovocitost, intenzita „mléčnosti“ a vegetativní aroma.

V tabulce 13 je znázorněno sensorické hodnocení vín podle úseček.

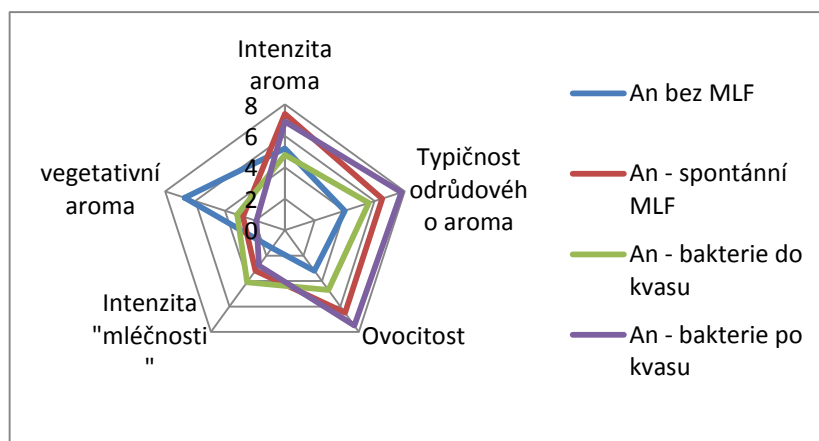
Tab. 13 Průměrné sensorické hodnocení vín dle úseček

Odrůda a způsob MLF	Intenzita aroma	Typičnost odrůdového aroma	Ovocitost	Intenzita „mléčnosti“	Vegetativní aroma
An – bez MLF	5,2	4	3,2	1,2	6,7
An – spontánní MLF	7,4	6,5	6,5	3,2	2,8
An – bakterie do kvasu	4,8	5,6	4,7	4,1	3,2
An – bakterie po kvasu	6,9	7,8	7,5	2,8	1,9
Fr – bez MLF	5,3	5,2	4,3	1,4	3,5
Fr – spontánní MLF	3,1	2,5	2,8	3,5	5,5
Fr – bakterie do kvasu	6,2	5,7	5,6	2,2	2,6
Fr – bakterie po kvasu	5,5	5,9	6,6	3,8	1,6
CM – bez MLF	6	6	4,5	2	6,2
CM – spontánní MLF	4,8	1,5	1,5	8,2	2,5
CM – bakterie do kvasu	5,1	4,3	2,7	4,3	3,4
CM – bakterie po kvasu	4,5	5,2	3,8	5,2	4,2

Podle degustátorů bylo nejintenzivnější aroma u vzorku An, kde proběhla MLF spontánně a nejméně intenzivní aroma bylo u vzorku CM, kde byly bakterie přidány do kvasu. Nejtypičtější odrůdové aroma se zdálo se hodnotitelům An bakterie po kvasu

a nejméně typické u CM spontánní MLF. Nejovocnější byly vzorky Fr a An po kvasu. A nejmenší ovocitost vykazovala CM spontánní MLF. Největší mléčnost byla patná u CM spontánní MLF a nejmenší u Fr bez MLF. Vegetativní aroma bylo nejvýraznější u An bez MLF a nejméně výrazné u vzorku Fr po kvasu.

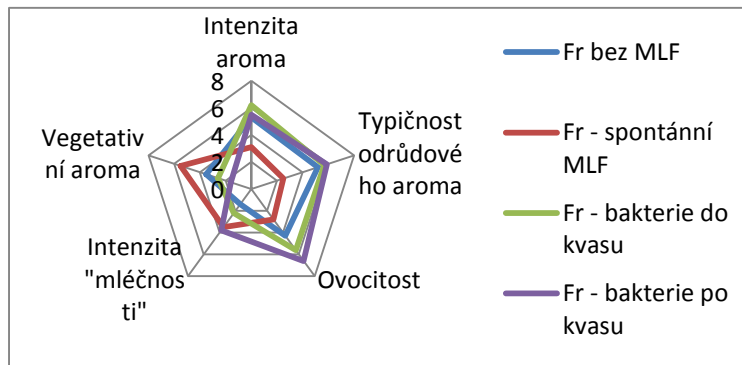
Graf 9 znázorňuje senzorický profil odrůdy André.



Graf 9 Senzorický profil vzorků odrůdy „André“

U odrůdy André měla dle senzorické analýzy malolaktická fermentace největší vliv na intenzitu aroma, typičnost odrůdového aroma, ovocitost a vegetativní aroma. Intenzita „mléčnosti“ byla hodnocena vcelku pozitivně. Nejvyšší intenzitu aroma vykazoval vzorek An spontánní MLF, jako vůně zralých višní, třešní a lehké připečené tóny. Typicky odrůdové se zdálo degustátorům víno An bakterie po kvasu, u kterého bylo čisté a kořenité aroma s tóny višní, ořechů a lesních plodů. Nejvyšší ovocitost vykazoval vzorek An bakterie po kvasu. Vegetativní aroma bylo nejvíce hodnoceno u An bez MLF, kde se projevovalo nevyzrálé aroma a lehké travnaté tóny. Z těchto výsledků senzorické analýzy lze usuzovat, že pro odrůdu André se nejvíce hodí bakterie přidávané do kvasu a spontánní MLF.

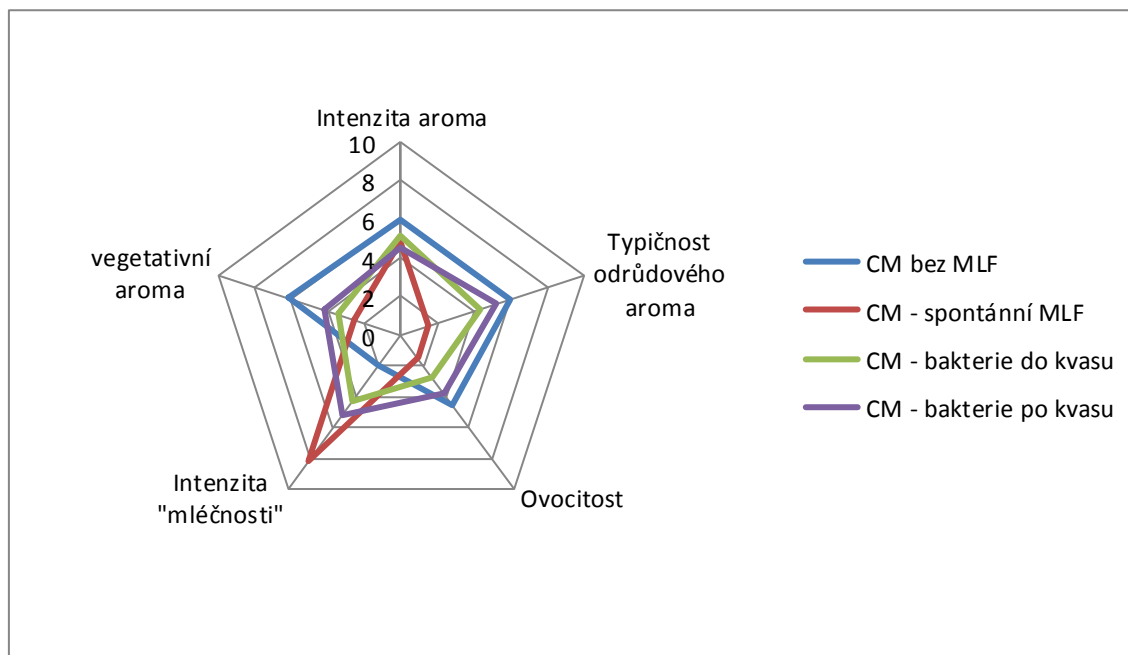
Graf 10 znázorňuje senzorický profil odrůdy Frankovka.



Graf 10 Senzorický profil vzorků odrůdy „Frankovka“

U odrůdy Frankovka se zdála hodnotitelům intenzita vůně nižší než u odrůdy André. Nejvyšší hodnoty vykazovala Fr do bakterie do kvasu. Odrůdová typičnost byla hodně podobná u Fr bakterie do kvasu a Fr bakterie po kvasu. Ve vůni byla cítit ostružina, višně a malina. Ovocitost byla nejvíce hodnocena u Fr po kvasu. Intenzita „mléčnosti“ nebyla obodována nijak záporně. Vegetativní aroma vykazovala Fr spontánní MLF, která byla hodnocena jako mírně zadušená s tóny vařeného zelí a žluklosti. Fr bez MLF v ničem výrazně nevyčnívala. Ze sensorické analýzy vyplývá, že pro odrůdu Frankovka se hodí jak bakterie, které se přidávají během AF, tak po AF.

Graf 11 znázorňuje sensorický profil odrůdy Cabernet Moravia.



Graf 11 Senzorický profil vzorků odrůdy „Cabernet Moravia“

U odrůdy Cabernet Moravia byly zřetelné nejvyšší hodnoty mléčných tónů ze všech odrůd. U vzorku CM spontánní MLF byly nejvýraznější mléčné až jogurtové tóny, které zastíraly jiné aromatické složky. Nejintenzivnější aroma a typičnost odrůdového aroma bylo u CM bez MLF. U tohoto vzorku bylo patrné vegetativní aroma zelených makovic spolu s černým rybízem. U vzorků, kde proběhla MLF bakteriemi do kvasu a po kvasu byly patrné krémové tóny, které lehce zastíraly černo rybízové a paprikové aroma.

6.4.2 Shrnutí sensorické analýzy

Podle výsledků z chemické analýzy jsou pro všechny tři odrůdy vhodné bakterie, které se přidávají po AF, což také potvrdilo sensorické hodnocení. To si odporovalo s chemickou analýzou při vzorku An spontánní MLF u vín, kde nebyla provedena MLF. Podle chemické analýzy zde byla naměřena nízká koncentrace esterů a množství diacetylu bylo nad práh vnímání. U odrůdy Frankovka se způsob inokulace bakterií hodnotově příliš nelišil, jak při chemickém, tak při analytickém hodnocení vykazovaly podobné hodnoty. Cabernet Moravia vykazovala při chemickém rozboru vysoké hodnoty, což se potvrdilo CM spontánní MLF. U vín CM bakterie do kvasu a CM

bakterie po kvasu degustátoři, tak vysoké hodnoty diacetylu neodhalili, jak tomu bylo při chemické analýze. Podle stobodového systému bylo nejlépe ohodnoceno An bakterie do kvasu, pak An spontánní MLF a třetí Fr bakterie do kvasu, z čehož vyplývá, že v pokusu nejlépe obstály bakterie, které byly přidávány po AF. Rozdíly mezi sensorickými a analytickými hodnotami mohli být způsobeny přítomností ostatních látek, které vznikli při MLF, AF, kvalitou hroznů ve vinici a kvalitativními parametry které hrozny v průběhu vegetace dosáhly. Tyto faktory mohly následně ovlivnit sensorický projev vín.

6.5 Statistická analýza

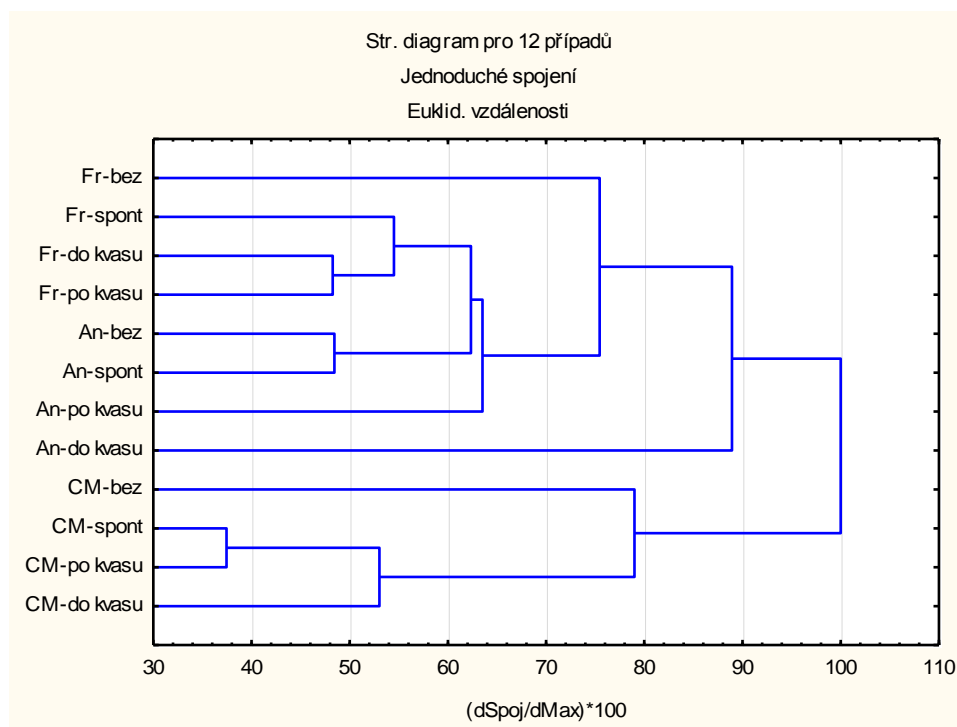
Výsledky chemické a sensorické analýzy jsou statisticky vyhodnoceny pomocí shlukové analýzy v programu *Statistica 12*.

6.5.1 Shluková analýza

Shluková analýza je vícerozměrná statistická metoda, která se používá ke klasifikaci objektů. Je používána ke třídění jednotek do skupin tak, aby jednotky, které patří do stejné skupiny, si byly podobnější než objekty ze skupin různých. Lze ji provádět jen u množiny objektů, které jsou popsány prostřednictvím stejného souboru znaků a má smysl je v dané množině sledovat. Shluky dat jsou popsány v tzv. dendrogramu.

Dendrogram chemické analýzy

Dendrogram sleduje podobnost šestnácti znaků chemické analýzy u dvanácti vzorků vína. Obrázek 10 znázorňuje dendrogram chemické analýzy.

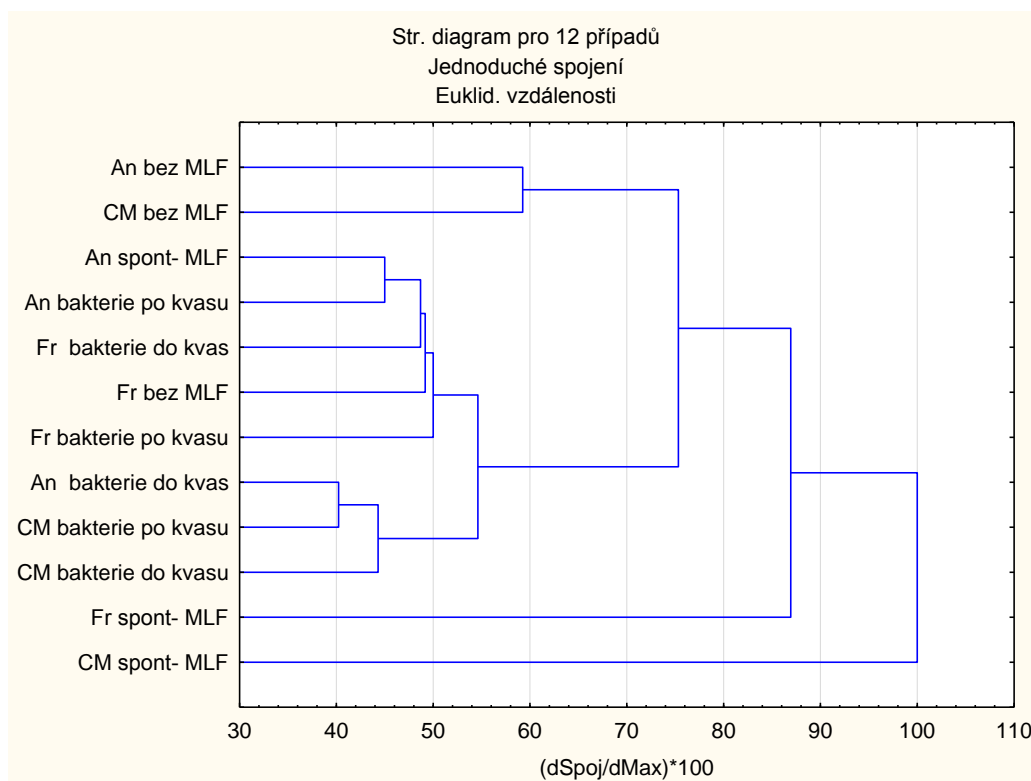


Obr. 10 Dendrogram chemické analýzy

Z dendrogramu je zřejmé, že podle chemické analýzy volatilních látek si jsou nejvíce podobné vzorky CM spontánní MLF a CM po kvasu, dále pak An bez MLF a An spontánní MLF. Stejnou podobnost vykazují Fr do kvasu a Fr po kvasu. Nejvíce odlišné jsou vzorky CM od vzorků Fr a An.

Dendrogram senzoričkého hodnocení

Dendrogram pozoruje podobnost pěti znaků senzoričké analýzy u dvanácti vzorků vína. Obrázek 11 znázorňuje dendrogram senzoričkého hodnocení.



Obr. 11 Dendrogram senzoričkého hodnocení

Z dendrogramu vyplývá, že podle degustátorů si jsou nejvíce podobné vzorky An bakterie do kvasu a CM bakterie do kvasu a dále pak An spontánní MLF a An bakterie po kvasu.

7 Diskuse

Proces výroby vína se neustále vyvíjí a nové technologické postupy se ve sklepním hospodářství neustále inovují. Naše vinohradnictví a vinařství spadá do severní vinohradnické oblasti, a proto je obsah kyseliny jablečné vyšší zvláště v horších ročnících. Malolaktická fermentace se stala nedílnou součástí celého procesu vinifikace. Ostrá kyselina jablečná se mění na jemnější kyselinu mléčnou, což vede k celkovému snížení kyselin a zvýšení pH. Víno se stává kulatější a plnější. Stabilita zde hraje také důležitou roli, protože odpadá riziko možného vzniku MLF v lahvi.

Experimentální část práce byla zaměřena na zkoumání vlivu různých způsobů MLF na aromatický profil červeného vína. Velké množství vinařů začíná poznávat výhody v inokulaci čistých kultur MB, které při vhodných podmínkách zajišťují úspěšné odbourání kyseliny jablečné. Spontánní MLF vede k většímu riziku nedokončení MLF.

LERM ET AL. (2010) uvádí, že u vín, kde byla MLF provedena vykazují vyšší ovocné aroma a kulatost než vína u kterých bylo odbourání kyseliny jablečné potlačeno. Všechna vína po MLF byla snadno rozlišitelná a bylo v nich potlačeno vegetativní a travnaté aroma, které mnohdy bývá spojováno s víny bez MLF. V pokusných variantách vzhledem k potlačené MLF nebyl zjištěn žádný diacetyl až na odrůdu André, u které mohlo dojít k jeho tvorbě kvasinkami nebo částečným odbouráním kyseliny jablečné na konci AF. Vzorky nevykazovaly známky negativních vůní jen u odrůd Frankovka a Cabernet Moravia bylo hodnotiteli konstatováno zvýšené vegetativní aroma.

BARTOWSKY AND HANDSCHE (2004) upozorňují, že biosyntéza diacetylu je závislá na metabolismu kyseliny citrónové, kde diacetyl vzniká jako jeho meziprodukt. Jeho koncentrace se odvíjí od kmenů MB způsobující MLF, fyzikálních a chemických parametrů vína, ale také přítomností kvasničných kalů. Dále uvádí, že diacetyl v menší míře tvoří také kvasinky, ale vzhledem k redukčním podmínkám na konci AF se jeho koncentrace pohybuje pod prahem vnímání. Práh rozpoznání je u červených vín mnohem vyšší než u bílých vín, která jsou na vysokou koncentraci mnohem citlivější. Jeho rozpoznatelnost může být snížena přítomností oxidu siřičitého, ale stárnutím vína

a jeho poklesem může koncentrace diacetylu opět narůst. Významnou roli hraje také množství inokula MB na začátku a také při dokončení MLF. Doporučuje se množství $0,5-5 \times 10^6/\text{ml}$ a za příznivých podmínek růst pokračuje až na koncentrace $10^8/\text{ml}$.

THEODORE (2004) zjistil, že v průběhu spontánní MLF dochází k produkci velkého množství sekundárních metabolitů. Divoké kmeny *Lactobacillus sp.* a *Pediococcus*, které se podílí na MLF vytváří velké množství těkavých kyselin a diacetylu. Tyto látky mohou při vysokých koncentracích zastírat svoje původní odrůdové aroma, a co víc, diacetyl ve velkém množství 8-14 ml/l působí jako pekařské kvasnice. To také ověřila tato práce. U odrůdy Cabernet Moravia byla chemickou analýzou zjištěna velmi vysoká koncentrace diacetylu. Takové aroma bylo hodnoceno velmi negativně, jako aroma zakysané smetany. U odrůdy André bylo naměřeno také nejvyšší množství diacetylu u spontánní MLF, ale hodnotiteli to nebylo hodnoceno nijak záporně. Spontánní MLF u odrůdy Frankovka vykazovala poměrně nízké hodnoty diacetylu, ale poměrně vysoké hodnoty sirných sloučenin, které vedly k zadušenému aroma a tónům vařeného zelí. Divoké bakterie, které se mohou podílet na spontánní MLF jsou schopné způsobovat hořkost nebo tvorbu nežádoucích biogenních aminů. Dle BISSON (2001) je spontánní MLF podrobena podobnému riziku jako spontánní alkoholové kvašení a dokonce může mít daleko negativnější dopad, který může vést až ke zkažení vína, protože není jisté, který kmen bude MLF způsobovat.

Jak uvádí LONVAUD-FUNEL (2004) MB pochází z hroznů a množství populace se mění v závislosti na posledních dnech zrání, zejména ji ovlivňuje vlhkost, teplota a UV záření. Před začátkem AF se nachází v moštu $10^2/\text{ml}$ až $10^4/\text{ml}$ populace MB. Zasiřením, které se provádí z důvodu oxidace moštu, toto množství ještě snižuje. Spontánní MLF zahajuje $10^6/\text{ml}$ populace MB. Kvasinky jsou lépe uzpůsobené obtížným podmínkám v moštu, vysoké kyselosti a osmotickému tlaku. Na konci AF populace MB rychle roste a náročné podmínky nejlépe zvládají *O. oeni*. Ostatní druhy mohou zůstat aktivní během skladování a způsobit kažení vína. MALDHERBE (2010) ve svém pokusu na odrůdách Shiraz a Pinotage uvádí důležitost výběru správného kmene pro kvalitní a bezproblémový průběh MLF. Byly pozorovány rozdíly mezi víny, kde MLF probíhala různými startovacími kulturami v širokém spektru vůní, jako

ovocné, krémové, ořechové atd. Ukázaly se velké rozdíly ve spotřebitelském vkusu hlavně v preferencích hebkosti a taninové bohatosti.

Existují tři možné způsoby inokulace čistých kultur mléčných bakterií. Prvním způsobem je aplikace MB současně s kvasinkami, dále pak očkování MB v průběhu AF a posledním je inokulace po dokončení AF. KONEČNÝ (2010) zmiňuje, že současným naočkováním vybraných MB spolu s kvasinkami je zajištěna lepší aklimatizace bakterií mléčného kvašení a také dobrý průběh MLF. Tento způsob je bezpečný, pokud jsou splněny vhodné podmínky, a to analytické parametry moštu, teplota a správný výběr kvasinek a MB. Hodnoty u odrůd André a Frankovka při inokulaci MB na začátku AF nevykazovaly nijak zvláštní hodnoty a to také odpovídalo sensorickému hodnocení. U odrůdy CM byly naměřeny nadprůměrné hodnoty diacetylu. BISSON (2001) uvádí, že současné naočkování kvasinek a bakterií může vést ke zvýšené produkci kyseliny octové, protože může dojít k vyčerpání živin a tím ke zpomalení fermentace. Kvasinky vždy získají převahu nad bakteriemi, ale problémem může být víno se zbytkovým cukrem, který vinou nedostatku živin zůstal ve víně. Následně jej mohou bakterie upřednostnit před kyselinou jablečnou a transformovat na kyselinu octovou.

STEIDL (2003) naproti tomu uvádí, že odbourání kyselin by mělo být zahájeno po lisování červeného vína, neboť při opožděné AF mohou MLF zahájit nežádoucí kmeny MB a metabolizovat cukry a tím se zvyšuje riziko vzniku vad vína. To potvrzuje také LERM ET AL. (2010), kdy uvádí výhodu inokulace MB po skončení AF a ponechání vína na jemných kvasničných kalech. HENICK-KLING (2004) uvádí, že enzymy produkované bakteriemi narušují buněčné membrány kvasinek a prostřednictvím autolýzy kvasinek poskytují MB dostatek živin a tím výrazně ovlivňují délku MLF. Naproti tomu různé kmeny kvasinek mohou působit na MB toxicky, protože vytváří velké množství oxidu siřičitého. *O. oeni* jsou velmi citlivé k inhibici oxidem siřičitým. Jeho produkce může být ovlivněna dávkou živin při AF. Nedostatek dusíkatých látek způsobuje, že vznikne nerovnováha mezi množstvím dusíku a metabolismem síry a tím k produkci oxidu siřičitého kvasinkami. Dostatečné množství dusíkaté výživy působí stimulačně také pro MB po AF. Ty potřebují pro svůj růst hlavně aminokyseliny a vitamíny.

To se také potvrdilo v této práci. Bakterie naočkované po AF byly schopné přeměnit téměř všechnu kyselinu jablečnou na kyselinu mléčnou. Bylo vyprodukováno velké množství ovocných esterů, což bylo kladně hodnoceno v sensorické analýze, ale zároveň malé množství nežádoucích sekundárních produktů. Zvláště odrůdě André MB a způsob provedení MLF velmi svědčily, protože jako první metabolizovala kyselinu jablečnou a zároveň vykazovala nejvyšší známky ovocitosti. Bylo zaznamenáno zvýšené množství diacetylu u odrůdy Cabernet Moravia, což nebylo hodnoceno nijak negativně.

MALDHERBE (2010) uvádí, že inokulace MB během AF není příliš běžná. Různé výzkumy ukázaly, antagonismus mezi kvasinkami a bakteriemi mléčného kvašení a největší v průběhu AF, kdy dochází k drastickému poklesu populace bakterií, ztrátě živin, zvýšení koncentrace oxidu siřičitého a množství alkoholu.

Podle LERM ET AL. (2010) je pro kvalitně provedenou MLF důležitý její monitoring. Sledováním populace MB, které jsou zodpovědné za MLF má vinař kontrolu nad celým průběhem odbourávání jablečné kyseliny a může lépe předcházet případným problémům. Důležité je pozorovat množství inokula pro nastartování MLF, tak aby nezískaly převahu divoké kmeny *Pediococcus* a *Lactobacillus*. Dostupné informace o MLF a MB mohou vinaři pomoci k zajištění úspěšnému odbourání kyseliny jablečné. Ta zahrnuje kompletní degradaci kyseliny jablečné, mikrobiologicky stabilní víno a zajištění pozitivního aroma. Vinař může ovládat fyzikálně-chemické parametry, jako teplotu mezi 18 až 20 °C, pH 3,1-3,5 a celkový oxid siřičitý pod 30 mg/l. Dalším rozhodujícím faktorem je výběr správného kmene MB, tak aby minimalizoval škody, které může MLF způsobit.

Pro realizaci MLF byly v sensorické analýze vyhodnoceny bakterie, které se přidávají do vína po dokončení AF. Podle degustátorů vykazovala vína nejvyšší ovocitost a typické odrůdové aroma. Určitě by byl zajímavý další výzkum jiných druhů bakterií, kterých je na trhu velké množství od různých firem. Rozhodně stojí za úvahu neponechat MLF náhodě a její průběh raději kontrolovat čistou kulturou MB.

8 Závěr

Tato práce se zabývá vlivem malolaktické fermentace na vytváření aromatického profilu červených vín. Hlavním sekundárním produktem je diacetyl. Při nízkých koncentracích dodává vínu krémovou vůni a chuť a při velkém množství je aroma ovlivněno silnými jogurtovými tóny až vůní zakysané smetany a tím překrývá estery a další sloučeniny vznikající při AF a MLF.

U tří modrých odrůd byly analyzovány volatilní látky. Jednalo se o odrůdy André, Frankovka a Cabernet Moravia. Byla vyrobena čtyři vína z každé odrůdy. U prvního vzorku MLF nebyla provedena, u druhého proběhla spontánně a do třetího a čtvrtého vzorku byly inokulovány komerční MB. Testované MB byly od firmy erbsloeh a komerční název kmenů *Oenococcus oeni* byl *BioStart Vitale SK11* a *BioStart Forte SK2*. Kultura *BioStart Vitale SK11* byla naočkována po AF a má velkou toleranci k vysokému alkoholu a k vyšším hodnotám SO₂. Kmen *BioStart Forte SK2* byl výrobcem doporučen k inokulaci na začátku AF.

Na základě senzoričského a analytického hodnocení se dalo zhodnotit vliv tří způsobů provedení MLF na výsledné aroma vína. Výsledkem pokusu je realizace MLF v červených vínech a doporučení naočkovat MB po ukončení AF. U varianty spontánní MLF byl kladně hodnocen jen vzorek An, ale vzorek Fr dopadl o dost hůř pro své zadušené aroma, dále pak CM byla hodnocena nejhůře ze všech vzorků. Zde se potvrdila chemická analýza a vznik velkého množství diacetylu, což bylo degustátory hodnoceno velmi negativně. U způsobu inokulace MB do AF byly výsledky dosti průměrné a žádný ze vzorků nevyčníval, jak pro své negativní, tak pro své pozitivní hodnocení. Nejlépe dopadly vzorky, u kterých byly bakterie naočkovány po AF. Vzorky vykazovaly vyšší tvorbu esterů a nižší koncentraci diacetylu. Víno André bylo dokonce vyhodnoceno jako nejlepší pro svou ovocitost a odrůdovou typičnost.

Všechna vína se prezentovala bezproblémovou MLF, jen u některých vzorků zůstal nepatrný zbytek kyseliny jablečné. Pokus poodhalil, že nejrizikovější je spontánní MLF pro vysokou tvorbu nežádoucích vedlejších produktů.

Přínosem této práce je zhodnocení různých způsobů provedení MLF a její vliv na aroma červeného vína. V našich zeměpisných podmínkách je odbourání ostré kyseliny jablečné nezbytné hlavně v porovnání se světovou konkurencí.

9 Souhrn

Vliv malolaktické fermentace na aromatický profil červeného vína

Tato diplomová práce se zabývá vlivem malolaktické fermentace na aromatický profil červeného vína. Literární část se věnuje definování malolaktické fermentace a popisuje volatilní látky, které vznikají při malolaktické fermentaci. Praktická část vychází z experimentu různých druhů malolaktické fermentace, při kterých jsou použity dva různé kmeny mléčných bakterií. Pokus byl prováděn na třech různých odrůdách vín, které byly senzorycky a analyticky vyhodnoceny.

Z modrých odrůd André, Frankovka a Cabernet Moravia bylo vyrobeno dvanáct druhů vín. Z každé odrůdy byl jeden vzorek kontrolní, u kterého nebyla provedena malolaktická fermentace. U dalšího vzorku bylo provedeno spontánní odbourání kyseliny jablečné, do dalšího byly přidány bakterie na začátku alkoholové fermentace. Do posledního vzorku byly přidány mléčné bakterie až po malolaktické fermentaci. V chemické analýze byl proveden rozbor volatilních látek vín a v senzorycké analýze byl hodnocen aromatický profil vyrobených vín. Nejlépe byla hodnocena vína, do kterých byly přidány mléčné bakterie po alkoholové fermentaci.

Klíčová slova

malolaktická fermentace, mléčné bakterie, kvasničné kaly, pokus

10 Resume

Effect of malolactic fermentation on the aroma profile of red wine

This master's thesis is specifically concerned with the influence of malolactic fermentation on the aromatic profile of red wine. The literary (theoretical) part defines the malolactic fermentation and describes the volatile substances formed during malolactic fermentation. The practical part results from an experiment of various kinds of malolactic fermentation, where there are used two different strains of lactic acid bacteria. The experiment was carried out on three different varieties of wines which were sensorically and analytically evaluated.

There were twelve kinds of wines produced from the red varieties of André, Frankovka and Cabernet Moravia. For each variety there was one control sample without malolactic fermentation being used. The spontaneous biological degradation of malic acids was used in another sample. The bacteria was added at the beginning of alcoholic fermentation into the next sample. The lactic bacteria was added after malolactic fermentation into the last sample. The chemical analysis provided analysis of volatile compounds in wine and the sensory analysis evaluated the aroma profile of produced wines. The top evaluated wines were wines in which lactic bacteria has been added after alcoholic fermentation.

Keywords

malolactic fermentation, lactic acid bacteria, yeast sludge, experiment

11 Literatura

BALÍK, Josef. *Vinařství: návody do laboratorních cvičení*. 3. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2006. ISBN 80-715-7933-5.

BAROŇ, Mojmír. Biologické odbourání kyselin. *Vinařský obzor: Odborný časopis pro vinohradnictví, sklepní hospodářství a obchod vínem*. 2011, roč. 104, č. 10, s. 510-512. ISSN 1212-7884.

BARTOWSKY, Eveline J. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology*, 2008. ISSN 0266-8254. [online], [cit. 2015-03-05]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2008.02505.x/epdf>

BARTOWSKY, Eveline J. a Paul A. HENSCHKE. The Buttery attribute of wine – diacetyl, Desirability, spoilage and beyond, Butter or no butter. *Wine quality and malolactic fermentation*. Lallemand: Porto, 2004, roč. 2004, s. 11-17. [online], [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: http://www.proenol.com/files/editorials/XVI_Porto_2004_Wine_quality_malolactic_fermentation.pdf.pdf

BISSON, Linda. *Wine Composition*. University of California at Davis: 2001. [online], [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://fbisson.ucdavis.edu/PDF/VEN124%20Section%201.pdf>

ČECH, Jaroslav. *222 let obce Moravský Žižkov*. Brno: F. R. Z. agency, 2014. ISBN 978-80-87332-79-5.

EDER, Reingard, et al. *Vady vína*. Valtice: Národní vinařské centrum, 2006. ISBN 80-903-201-6-3.

FURDÍKOVÁ, Katarína a Fedor MALÍK. Jablčno-mliečna fermentácia. *Vinařský obzor: Odborný časopis pro vinohradnictví, sklepní hospodářství a obchod vínem*. 2009, roč. 102, č. 7-8, s. 337339. ISSN 1212-7884.

HAVRAN, Ondřej a Pavel STRATIL. Biologické odbourávání kyselin. *Vinařský obzor: Odborný časopis pro vinohradnictví, sklepní hospodářství a obchod s vínem*. 2008, roč. 101, č. 12, s. 584-586. ISSN 1212-7884.

HENICK-KLING, Thomas et al. Yeast-Bacteria interaction – possible nutrient strategies. *Wine quality and malolactic fermentation*. Lallemand: Porto, 2004, roč. 2004, s. 25-31. [online], [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: http://www.proenol.com/files/editorials/XVI_Porto_2004_Wine_quality_malolactic_fermentation.pdf.pdf

HLOŽKOVÁ, Jana. *Složení, nemoci a analýza vína, literární rešerše*. Bakalářská práce. Brno: Masarykova univerzita, 2008. Vedoucí práce Mgr. Jiří Žeravík, PhD. [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/175130/prif_b/Jana_Hlozkova-bakalarska_prace.txt

HORNSEY, Ian. *The Chemistry and Biology of Winemaking*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2007. ISBN-13: 978-0-85404-266-1.

JACKSON, Ronald S. *Wine Science: Principles and Applications*. California: Academic Press is an imprint of Elsevier, 2008. ISBN: 978-0-12-373646-8.

Erbslöh [online]. [cit. 2015-03-05]. Dostupné z: <http://www.erbsloeh.com/de/home>

KONEČNÝ, Antonín. Výhody koinokulace – aplikace kvasinek a bakterií současně. *Vinařský obzor: Odborný časopis pro vinohradnictví, sklepní hospodářství a obchod s vínem*. 2007, roč. 100, č. 5, s. 235. ISSN 1212-7884.

KYSELÁKOVÁ, Marie a Josef BALÍK, Jaromír VEVERKA. Přehled používaných hodnotících systémů tichých vín, *Vinařský obzor: Odborný časopis pro vinohradnictví, sklepní hospodářství a obchod s vínem*. 2003, roč. 96, č. 3, s. 145-146. ISSN 1212-7884.

LAHO, Ladislav, Erich MINÁRIK a Anton NAVARA. *Vinárstvo: chémia, mikrobiológia a analytika vína*. 1. vyd. Bratislava: Príroda, Vydavateľstvo pôdohospodárskej literatúry, 1970.

LERM, E., ENGELBRECHT, L. a M. DU TOIT, M., 2010. Malolactic fermentation: The ABC's of MLF. In: *S. Afr. J. Enol. Vitic.* Stellenbosh univerzity Library and information service. [online], [cit. 2015-02-03]. Dostupné z: <http://www.sasev.org/>

LITERÁK, Jaromír. Plynová chromatografie. In: *Cheminfo: Server chemické sekce.* [online]. [cit. 2015-03-30]. Dostupné z: http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf

LITSCHMANN, Tomáš. Povětrnostní podmínky v Moravské vinařské oblasti v roce 2014. *Vinařský obzor: Odborný časopis pro vinohradnictví, sklepní hospodářství a obchod s vínem.* 2015, roč. 108, č. 1, s. 26-29. ISSN 1212-7884.

LONVAUD-FUNEL, Aline. Indigenous Lactic acid bacteria and selected lactic acid bacteria. *Wine quality and malolactic fermentation.* Lallemand: Porto, 2004, roč. 2004, s. 5-9. [online], [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: http://www.proenol.com/files/editorials/XVI_Porto_2004_Wine_quality_malolactic_fermentation.pdf.pdf

MALHERBE, Sulette. *Investigation of the impact of commercial malolactic fermentation starter cultures on red wine aroma compounds, sensory properties and consumer preference.* Disertační práce. Stellenbosch: Stellenbosch University, 2010.

Mendelu. Vinařství. [online], [cit. 2015-04-30]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=1266

MICHLOVSKÝ, Miloš. *Lexikon chemického složení vína.* Rakvice: Vinselekt Michlovský, 2014. ISBN 978-80-905319-2-5.

MINÁRIK, Erich. Stimulácia malolaktických baktérií vínnymi kvasinkami. *Vinařský obzor: Odborný časopis pro vinohradnictví, sklepní hospodářství a obchod s vínem.* 2005, roč. 98, č. 11, s. 554. ISSN 1212-7884.

MINÁRIK, Erich. Úskalja spontánnej malolaktickej fermentácie. *Vinařský obzor: Odborný časopis pro vinohradnictví, sklepní hospodářství a obchod s vínem.* 2008, roč. 101, č. 9, s. 419. ISSN 1212-7884.

MINÁRIK, Erich. Vplyv sirných aminokyselín a glutationu na malolaktickú fermentáciu. *Vinařský obzor: Odborný časopis pro vinohradnictví, sklepní hospodářství a obchod s vínem*. 2008, roč. 101, č. 11, s. 529. ISSN 1212-7884.

PAVELKOVÁ, Irena. Několik poznámek k úspěšné jablečno-mléčné fermentaci. *Vinařský obzor: Odborný časopis pro vinohradnictví, sklepní hospodářství a obchod s vínem*. 2007, roč. 100, č. 11, s. 543-544. ISSN 1212-7884.

RIBÂÉREAU-GAYON, Pascal, Denis DUBOURDIEU a Bernard DONÁECHE. *Handbook of enology*. Chichester, West Sussex, England. 2006. ISBN 0470010371, 9780470010372, 0470010398, 9780470010396. [online], [cit. 2015-02-05]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1002/0470010398>.

SOTOLÁŘ, Radek. Výukové materiály. Předmět: Vinohradnictví BC.

STEIDEL, Robert. *Sklepní hospodářství*. Valtice: Národní salon vín, 2002. ISBN 80-903201-0-4.

STEIDEL, Robert a Wolfgang RENER. *Moderní příprava červeného vína*. Valtice: Národní salon vín, 2003. ISBN 80-903201-2-0.

ŠVEJCAR, Václav. Choroby vína – vláčkovatění a zvrhnutí vína. *Vinařský obzor: Odborný časopis pro vinohradnictví, sklepní hospodářství a obchod s vínem*. 2006, roč. 99, č. 1-2, s. 34. ISSN 1212-7884.

THEODORE, Didier. Malolactic fermentation without control. *Wine quality and malolactic fermentation*. Lallemand: Porto, 2004, roč. 2004, s. 53-54. [online], [cit. 2015-04-23]. Dostupné z: http://www.proenol.com/files/editorials/XVI_Porto_2004_Wine_quality_malolactic_fermentation.pdf.pdf

Wiley Online Library. [online], [cit. 2015-04-30]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2008.02505.x/full>