

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>1. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1 Období růstu révy vinné</b> .....	<b>9</b>
1.1.1 Fenofáze slzení a rašení .....	10
1.1.2 Fenofáze prodlužovacího růstu .....	12
1.1.3 Celková listová plocha.....	16
1.1.4 Fenofáze kvetení .....	17
1.1.5 Fenofáze vyzrávání plodů a dřeva, fenofáze dormance zimních oček a období klidu .....	19
1.1.6 Změny cukrů a kyselin v hroznech v průběhu zrání .....	20
<b>1.2 Možnosti regulace listové plochy v průběhu vegetace</b> .....	<b>25</b>
1.2.1 Zkracování letorostů – Osečkování .....	26
1.2.2 Odlistění v zóně hroznů .....	27
<b>1.3 Biochemické změny v průběhu výroby vína</b> .....	<b>29</b>
<b>1.4 Glykolýza a alkoholové kvašení</b> .....	<b>29</b>
<b>1.5 Alkoholové kvašení a růst kvasinek</b> .....	<b>31</b>
1.5.1 Vývoj kvasinek v průběhu alkoholového kvašení .....	33
1.5.2 Vedlejší produkty alkoholového kvašení.....	34
<b>1.6 Jablečno-mléčná fermentace</b> .....	<b>36</b>
1.6.1 Bakterie mléčného kvašení .....	37
1.6.2 Metabolismus bakterií v průběhu jablečno-mléčné fermentace .....	42
1.6.3 Vývoj bakterií při výrobě vína.....	44
1.6.4 Vliv fyzikálně chemických faktorů na růst bakterií.....	49
<b>2. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>53</b>
<b>3. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>54</b>
<b>3.1 Hodnocení vybraných parametrů hroznů v závislosti na velikosti listové plochy révového keře</b> .....	<b>54</b>
3.1.1 Charakteristika stanoviště .....	54
3.1.2 Sledované odrůdy v letech 2008 - 2010.....	56
3.1.3 Redukce listové plochy na keřích révy vinné .....	57
3.1.4 Stanovení velikosti listové plochy keře révy vinné .....	58
<b>3.2 Hodnocení vybraných parametrů červených vín v průběhu jablečno-mléčné fermentace</b> .....	<b>58</b>
3.2.1 Použité vzorky vína a mléčných bakterií v roce 2008 .....	58

3.2.2	Použité vzorky vína a mléčných bakterií v roce 2009 .....	59
3.2.3	Použité vzorky vína a mléčných bakterií v roce 2010 .....	59
<b>3.3</b>	<b>Hodnocení vybraných látkových složek.....</b>	<b>60</b>
3.3.1	Stanovení hodnoty pH a obsahu titrovatelných kyselin.....	60
3.3.2	Stanovení obsahu rozpustné sušiny .....	60
3.3.3	Stanovení obsahu organických kyselin.....	60
3.3.4	Stanovení obsahu 2,3-butandionu, 2,3-pentandionu a acetoinu .....	61
3.3.5	Stanovení antioxidační kapacity metodou FRAP .....	61
3.3.6	Stanovení antioxidační kapacity metodou DPPH.....	62
3.3.7	Stanovení obsahu alkoholu .....	63
3.3.8	Stanovení barevných změn .....	63
<b>3.4</b>	<b>Použité statistické metody .....</b>	<b>64</b>
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>65</b>
<b>4.1</b>	<b>Hodnocení velikosti listové plochy.....</b>	<b>65</b>
<b>4.2</b>	<b>Hodnocení vybraných parametrů hroznů v závislosti rozsahu zakrácení letorostů.....</b>	<b>66</b>
4.2.1	Vliv velikosti listové plochy keře na obsah rozpustné sušiny v hroznech	66
4.2.2	Vliv velikosti listové plochy keře na obsah titrovatelných kyselin v hroznech .....	76
4.2.3	Vliv velikosti listové plochy keře na hodnotu pH a poměr organických kyselin v hroznech .....	85
<b>4.3</b>	<b>Hodnocení jakostních parametrů červených vín v průběhu jablečno-mléčné fermentace.....</b>	<b>99</b>
4.3.1	Vliv použitého inokulačního preparátu na změny organických kyselin...	99
4.3.2	Vliv použitého inokulačního preparátu na obsah titrovatelných kyselin	112
4.3.3	Vliv použitého inokulačního preparátu na obsah antioxidační kapacity	116
4.3.4	Vliv použitého inokulačního preparátu na obsah alkoholu a vybraných karbonylových sloučenin .....	119
4.3.5	Vliv použitého inokulačního preparátu na barevné změny ve víně.....	122
<b>5.</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>126</b>
<b>6.</b>	<b>SOUHRN.....</b>	<b>131</b>
	<b>RESUME .....</b>	<b>132</b>
<b>7.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>133</b>

## ÚVOD

V současné době se stále častěji setkáváme s narůstající poptávkou po kvalitních vínech. Od dob, kdy se při výrobě vína dávala přednost kvantitě nad kvalitou, se rychle vzdalujeme a nyní se miska pomyslných vah začíná převažovat na stranu kvality. Informovanost zákazníků stoupá a jejich preference se často přiklání spíše k chuťovému charakteru vína, než k jeho ceně.

Vyrobít kvalitní víno není pouze otázkou technologického zpracování, ale základ je dán již na vinici. Mimo obsahu cukrů a kyselin v hroznech je důležité také zastoupení fenolických a aromatických látek, které mohou dát vínu typickou chuť a plnost. Některé z těchto látek se tvoří v průběhu zrání v listech a pomocí cévních svazků jsou transportovány do hroznů. Agrotechnické zásahy, které provádíme na vinici, tedy mohou sloužit nejen k regulaci výnosu, ale mohou také ovlivnit složení samotných hroznů. Většina těchto zásahů se provádí z důvodu regulace listové plochy a v dnešní době se bez nich neobejdeme, pokud chceme získat kvalitní hrozny. Klíčem ke správnému provedení těchto činností je dostatečné pochopení fyziologických procesů, které probíhají v rostlině révy vinné. Samotné fyziologické procesy, ale ještě nejsou rozhodujícím činitelem pro správnou volbu ošetření. Vždy je nutné přihlídnout k dalším faktorům, mezi které patří především klimatické podmínky daného stanoviště, dále odrůda révy vinné, stáří vinice a v neposlední řadě také očekávaná kvalita vypěstovaných hroznů.

Ze sklizených hroznů se v průběhu technologického zpracování vyrobí víno. Základním procesem této výroby je alkoholová fermentace, při které se z cukrů tvoří prostřednictvím kvasinek alkohol a oxid uhličitý. Především v chladnějších oblastech se provádí u červených a v některých případech i bílých vín biologické odbourávání kyseliny jablečné neboli jablečno-mléčná fermentace. Na rozdíl od alkoholové fermentace se na tomto procesu podílejí bakterie mléčného kvašení. Hlavním cílem je snížit ostrou chuť kyseliny jablečné, která se přemění na chuťově jemnější kyselinu mléčnou. V průběhu jablečno-mléčné fermentace mohou vznikat i některé vedlejší produkty, jako například diacetyl a acetoin, které mohou mít vliv na organoleptické vlastnosti výsledného vína. Tento proces není tak jednoduchý jak se zpočátku předpokládalo a ovlivňuje ho velké množství faktorů. Abychom ho dokázali řídit

a kontrolovat, musíme co nejvíce porozumět biochemickým pochodům, které při něm probíhají. Proto se v současné době zabývá jejich rozluštěním velké množství vědeckých prací a studií. A vzhledem k jeho stále častějšímu využití, se dá předpokládat, že bude cílem vědeckého zájmu i nadále.

# 1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

Réva vinná (*Vitis vinifera* L.) je rostlina patřící do rodu *Vitis*, jejíž původní domovina je oblast Středomoří, střední Evropa a jihozápadní Asie. V současné době existují tisíce odrůd révy vinné, ale jen málo z nich se komerčně využívá k produkci vína, nebo stolních hroznů (PAVLOUŠEK, 2007).

Při výrobě vína je základním měřítkem úspěchu vypěstovat zdravé a kvalitní hrozny. Po dobu zrání bobulí, od kvetení až po sklizeň, má na jejich kvalitu zásadní vliv ošetřování keře révy vinné. Účelem je udržení zdravého stavu celé rostliny, a to včetně hroznů, po celou dobu vegetace, s cílem zisku vysoce kvalitních surovin, s optimálním poměrem látkových složek. Ke každé produkci kvalitních hroznů neodmyslitelně patří široká škála pracovních úkonů, které se na vinici v průběhu roku provádí. Pro správné určení termínu a druhu těchto prací je zásadní znát vegetační cyklus révy vinné. Všechny úkony, které se ve vinici v průběhu roku provádí, je nutné provádět ve správném období v závislosti na aktuální fázi vývoje révového keře.

Roční cyklus révy vinné je proces, který se opakuje na vinici každý rok, od založení vinice až po její vyklučení. Každý krok v tomto procesu hraje důležitou roli na tvorbu hroznů a jejich vlastností pro výrobu vína. Délka trvání jednotlivých fází růstového cyklu je závislá na celé řadě faktorů, především na klimatických podmínkách a vlastnostech odrůdy (ROBINSON, 2006).

Vegetační cyklus révy vinné je možné rozdělit na jednotlivá období, která jsou tvořena fenofázemi. V průběhu jednoho roku lze rozdělit vegetaci na tři období. Období růstu, ve kterém dochází k narůstání nadzemních a podzemních orgánů. Období vyzrávání, charakteristické především akumulováním zásobních látek a přípravou na následující období, kterým je období klidu (HUBÁČEK, KRAUS, 2010).

## 1.1 Období růstu révy vinné

Pupeny listnatých ovocných stromů jsou v oblasti mírného pásma v podzimním a zimním období ve fázi klidu. Toto období je tvořeno endogenní dormancí, po které následuje dormance vynucená, neboli exogenní (LANG et al., 1987).

V zimním období dochází ke ztrátám vody prostřednictvím výparu z nadzemních částí rostliny. Aby nedošlo k nadměrnému vyschnutí, je tento vodní deficit doplňován z podzemních částí, kde bývá zpravidla vyšší vlhkost. Voda postupuje přes jednotlivé buňky pomalým pohybem do míst, kde je jí nedostatek (ROBINSON, 2006). V případě nepříznivého počasí nemusí být postup vody dostatečně rychlý, a může tak docházet k vyschnutí starého dřeva. Následkem suchých a větrných zim, tedy může dojít k popraskání nadzemních částí, k vyschnutí oček na distálních koncích tažňů, případně odumření celého keře (KRAUS, 1999)

### **1.1.1 Fenofáze slzení a rašení**

Prvním vnějším projevem biochemických změn v buňkách révy vinné po zimním klidu je slzení. Cévní svazky dřevní části kmenů jsou v zimním období naplněny vzduchem. Jakmile dojde na jaře ke zvýšení teploty půdy na 5 – 6 °C, dochází k obnovení jejich činnosti, protože se pomocí kořenového systému začíná transportovat voda a zásobní látky do ostatních nadzemních částí (SPERRY et al., 1987). Pletiva se prosycují vodou a připravují se na nadcházející vegetaci a období růstu. Jakmile dosáhne teplota půdy, do hloubky 25 cm, 8 - 10 °C, kořenový systém začne obrůstat kořenovým vlášením, které výrazně zvýší příjem vody a živin. Kořenové vlásky jsou v průměru široké asi jen 10 µm, ale mohou tvořit až 60 % celkové plochy kořenového systému (PAVLOUŠEK, 2011).

Fáze slzení se projevuje především vytékáním vody a asimilátů, nazývaných souhrnně jako míza, při kterých dochází k přerušení cévních svazků a začíná v období růstu kořenového vlášení (KRAUS, 2012). Je doprovázena fyziologickými změnami, především zvýšením propustnosti buněčných membrán a zvýšením intenzity dýchání. V obou fenofázích slzení i rašení postupuje míza z kořene směrem nahoru cévními svazky dřevní i lýkovou částí. Nejvyšší intenzitu slzení lze pozorovat v místech blízko kořenů a tam, kde jsou hlavní toky cévních svazků. Míza, která z ran vytéká, se v místě řezu postupně koncentruje a pomocí saprofytických hub a bakterií se začne tvořit sliz, který přerušené cévní svazky ucpe. Intenzita výtoku je vyšší ve dne, v noci je nižší. Za období slzení, které trvá 1 – 3 týdny, je jeden keř révy vinné schopen vyprodukovat až 5 litrů mízy (ROBINSON, 2006).

Míza je tvořena z převážné části vodou, obsahuje však také sušinu, která se pohybuje v rozmezí koncentrací 0,07 – 0,4 %. Rozpustná sušina je zastoupena především organickými látkami, jejichž poměr v míze není stálý, vyšší obsah redukujících cukrů v míze byl zjištěn při nižší teplotě prostředí. Dále se v míze vyskytují organické kyseliny v přibližné koncentraci 0,5 g.l<sup>-1</sup>. V menším zastoupení jsou minerální látky, především železo (200 – 450 mg.l<sup>-1</sup>), vápník (124 – 163 mg.l<sup>-1</sup>), draslík (54 – 157 mg.l<sup>-1</sup>) a hořčík (10 – 23 mg.l<sup>-1</sup>). Z dalších látek vyskytujících se v míze jsou to fytohormony (gibereliny, auxiny, cytokininy), jejichž obsah je závislý především na druhu podnože, na které je odrůda naštěpována. Obsahové složení fytohormonů v míze má velký vliv na následné procesy ovlivňující růst a plodnost odrůd (KRAUS et al., 2000; GALET, 2000; MILLS et al., 2006).

Následujícím procesem po slzení je rašení oček, které je vyvoláno zvyšující se teplotou okolního vzduchu. Tato teplota, tzv. tepelný práh se liší v rámci jednotlivých odrůd révy vinné. Je to průměrná denní teplota, při které začínají rašit očka. Vzhledem k tomu, že je rašení prvním viditelným projevem růstu po zimním klidu, byla pro révu vinnou mezinárodně přijata jako průměrná vegetační nula denní teplota 10 °C. Množství oček, které na jaře vyraší je závislé především na obsahu živin a vody v prostředí a samozřejmě počtem oček, který se na keři po řezu ponechá. Pokud není keř ovlivněn řezem, nevyraší více než polovina všech oček (GALET, 2000; POUGET, 1967; CAROLUS, 1970).

Původní stanoviště révy vinné lesní (*Vitis vinifera* L. ssp. *silvestris*) byly lužní lesy u toků velkých řek, kde docházelo k pravidelným jarním záplavám. Zvýšené množství vodní vláhly mělo příznivý vliv na rašení, a proto je tato potřeba zafixována v genetickém základu evropských odrůd révy. Pokud bylo v zimě vyšší množství srážek a půda obsahuje dostatek vláhly, rašení bývá pravidelné s intenzivním průběhem, opakem jsou suché zimy, kdy je rašení nepravidelné a trvá delší dobu (KRAUS et al., 2004). Na rozdíl od mnoha ovocných druhů, které tvoří zvláště generativní a vegetativní pupeny, plody i vegetativní části révy vinné vyrůstají ze stejných pupenů (PRATT, 1971). Jednotlivá očka jsou tvořena obvykle ze dvou vedlejších podoček a z jednoho hlavního pupenu. Podočka vyraší pouze v případě, že má keř dostatečné množství vláhly a živin, mohou v případě vymrznutí hlavních pupenů také zastávat jejich funkci (MAY, 2000). O intenzitě rašení oček rozhoduje také stupeň embryonálního vývoje dosažený

v předchozím roce. Pokud se očko vyvíjelo v paždí listů a fazochů, které příliš intenzivně rostly, vykazuje nižší stupeň diferenciaci než očka u nevyzrálých fazochů. Rašení urychluje také zvýšený obsah dusíku v půdě. Apikální dominance také ovlivňuje intenzitu rašení. Nejdříve a nejbuněji raší očka, která jsou umístěna na vrcholových částech révy (KRAUS, 2012).

Velký význam na rašení oček mají také fytohormony. Před příchodem zimního (endogenního) klidu jsou očka inhibována působením auxinů a kyseliny abscisové. Této vlastnosti se dá také využít pro umělé zadržení startu rašení. Aplikace kyseliny naftyloctové (NAA) počátkem března v koncentraci 500 – 100 ppm dokáže pozdržet rašení o 10 až 25 dnů. Fytohormony způsobenou inhibicí rašení ruší vlhký průběh zimy a jara (KRAUS, 2010).

### **1.1.2 Fenofáze prodlužovacího růstu**

Období rašení následuje fáze exponenciálního růstu letorostů. Tato fáze je charakteristická silnou apikální dominancí hlavních letorostů, za současné inhibice růstu boční letorostů (CANDOLFI-VASCONCELOS a KOBLET, 1990).

Jakmile vyraší očka, dochází k růstu letorostů, což jsou nejmladší části révového keře (VANEK, BRAUN, 2000). Ty rostou zpočátku pomalu, protože jsou vyživovány pouze ze zásobních látek, které jsou uloženy především v kořenovém systému. Se zvyšující se teplotou vzduchu dochází k urychlení růstu letorostů a vytváření prvních listů, které začínají tvořit nové asimiláty. Na rozdíl od slzení nemá na růst letorostů přímý vliv teplota půdy, na co však vliv má, je kumulování sušiny v letorostech. Stejným způsobem ovlivňuje letorosty intenzita osvětlení (BUTTROSE 1969; GALET, 2000; MAY et al. 1967). Dokud se na letorostu nevytvoří terminální pupeny, může růst letorostu teoreticky pokračovat tak dlouho, dokud to dovolí klimatické podmínky (JACKSON, 2000).

Růstové fáze u révy vinné lze rozlišit na embryonální, morfologické a prodlužovací. Embryonální probíhá při tvorbě zimních oček na prodlužujícím se letorostu. Ihned po ní navazuje fáze morfologická, při které dochází k diferenciaci listových hrbolků a k vytvoření hrbolků budoucích květenství. Morfologická fáze pokračuje v pupenech do nástupu dormantního stavu pupenů a po skončení dormanci



nastupuje v podzimním období interkalární růst naznačený internodií, a pak v jarním období dodatečná diferenciací. Prodlužovací fáze proběhne rychle po vyrašení oček. Lze tedy konstatovat, že agrotechnická opatření na keři révy vinné mohou mít vliv na tvorbu morfologických vlastností letorostů v následujícím vegetačním období (WILLIAMS, MATTHEWS, 1990). Způsob větvení révy vinné je monopodiálně sympodiální. Při monopodiálním způsobu boční výhonky nepřerůstají hlavní letorost, což jsou v případě révy vinné fazochy neboli zálistky. U sympodiálního větvení letorost uhýbá do strany a boční výhon jej přerůstá. Tento způsob větvení je u révy vinné dán historickým vývojem. Její přirozený výskyt především na okrajích lesů, kde bojovala o prostor, ji přinutil změnit se z původního keřovitého vzrůstu na liánovitou rostlinu. Osa letorostu je tvořena trojčleny, které jsou morfologickou jednotkou větvení a způsobují, že délky jednotlivých článků (internodií) nejsou stejné. Nejkratší je článek bez úponku, dalším je středně dlouhé sympodium a druhé sympodium je nejdelší. Tento sled se opakuje po celé délce letorostů (KRAUS et al., 2004). Rychlost růstu letorostů je ovlivněna především jejich postavením na keři. Nejrychleji rostou ty, které jsou umístěny blíže kořenovému systému. Pomalejší růst letorostů je také na dlouhých plodonosných větvích (WINKLER et al., 1974).

### **Listy**

Po kořenovém systému jsou listy druhým nejdůležitějším orgánem z pohledu výživy rostliny. Zastávají nezastupitelnou fyziologickou funkci při růstu a vývoji rostliny, mají zásadní vliv při tvorbě cukrů v bobulích. Listy se skládají z listové čepele, která má zoubkované okraje. List révy vinné je tvořen ze 3 až 7 laloků a jejich vysoká specifita v rámci odrůd je důležitým ampelografickým znakem. Listová čepel ze spodní i vrchní strany pokrývá epidermis, tvořena vrstvou plochých buněk. Vrchní strana listu je pokryta voskovou kutikulou a na epidermis spodní straně listu se vyskytují průduchy a trichomy. Průduchy slouží k regulaci transpirace z listů. V nepříznivých podmínkách (vysoká teplota, nižší vlhkost vzduchu) se vytváří vyšší množství kyseliny abscisové, která omezí otevírání průduchů. Pod epidermis se nachází vrstva palisádových parenchymových buněk, které obsahují velké množství chlorofylu. Tato část listu se podílí největší měrou na fotosyntetické aktivitě celé rostliny. Buňky houbového parenchymu, které se nachází pod výše zmíněnou vrstvou, obsahují méně chlorofylu a vytváří větší mezibuněčné prostory (LEE et al. 2012).

Dynamika růstu listů není lineární, nové listy zvětšují svoji plochu o 2 – 8 cm<sup>2</sup> za den. V období maximálního růstu jsou listy schopné svoji plochu navýšit o 8 – 20 cm<sup>2</sup> denně. Růst listové čepele trvá přibližně 25 – 35 dnů. Přibližně ve čtyřicátý den svého vývoje dosahují listy vrcholu své asimilační schopnosti. Počet listů na letorostu se postupně zvyšuje, do fáze kvetení je jejich počet v rozmezí 7 – 8 a po odkvětu 10 – 12. Rychlost růstu listů je závislá ve velké míře na teplotě, jejíž optimální hodnota je 28 – 30 °C. Míra osvětlení má vliv na šířku listů. Nejširší jsou listy, které mají největší expozici ke slunečnímu záření. Tyto listy mají širší vrstvu epidermis i houbový parenchym. Parenchymatické palisádové buňky jsou protáhlejší u osvětlených listů a obsahují větší počet menších chloroplastů. Listy ve stínu mají menší počet průduchů a jsou tenčí (KRAUS, 2010).

Jakmile dosáhnou listy 30 % své konečné velikosti, dochází v nich k exportování asimilátu, současně však stále přijímají asimiláty z jiných listů. Tento příjem ustane, když listy dosáhnou 50 % konečné velikosti. Asimiláty proudí rychlostí 25 – 30 cm za hodinu, a to ze spodních listů do květenství a ke kořenovému systému a z listů v horních částech do vrcholů letorostů. Rozhraní mezi určením cíle toku asimilátů se v průběhu růstu posouvá směrem k vrcholu letorostů. Dalo by se říci, že listy spodních dvou třetin letorostu mají význam na množství sklizně, zatímco listy vrchní třetiny letorostu mají význam pro jakost sklizně (PAVLOUŠEK, 2011). Významnými faktory, které ovlivňují intenzitu fotosyntézy v listech, jsou teplota a sluneční záření. SCHULTZ (2008) uvádí, že optimální teplota listů pro průběh fotosyntézy je v rozmezí 18 – 34 °C. Teploty, které jsou mimo toto rozmezí, snižují intenzitu fotosyntézy, avšak významnější negativní vliv se projevuje u nižších teplot pod 15 °C než u vyšších teplot nad 40 °C (PROCHÁZKA, 2005).

Transpirace se děje prostřednictvím povrchových struktur tzv. průduchů. Na intenzitu transpirace má vliv celá řada faktorů. Především je to odrůda révy vinné, dále teplota prostředí, intenzita osvětlení, vlhkost vzduchu a půdy aj. Intenzita transpirace v průběhu dne má v jarních měsících podobu křivky s jedním maximem (kulminace kolem 13. hodiny), v době kdy dochází k zavěšování hroznů, se mění transpirační křivka na dvouvrcholovou (nejvyšší intenzity transpirace jsou kolem 11. a 15. hodiny). Při zaměkání a zrání bobulí je transpirace výrazně nižší než v období růstu. Útlum transpirace je doprovázen také snížením nebo zastavením fotosyntézy,

tedy i produkcí cukrů. Tento jev negativně ovlivňuje růst bobulí, obsah cukrů v nich a vyzrávání dřeva, především v suchých a horkých obdobích. Množství vody, které z révy odchází v podobě výparu, je velice rozdílné v závislosti na tvaru a pěstované odrůdě. Více olistěné odrůdy ztrácí více vody než odrůdy s menším počtem listů. Při způsobu vedení rýnsko-hesenskému, které je na území České republiky nejrozšířenější, dochází k výparu v množství 3 – 5 litrů vody za den.

Dalším projevem životních pochodů v révě je dýchání listů. Nejvíce dýchají mladé listy na vrcholových částech letorostů. Nejintenzivněji dýchají, v období po odkvětu a při tvorbě bobulí, listy raných odrůd, naopak listy pozdní odrůdy v období zrání hroznů. Zvýšená intenzita dýchání byla také pozorována na keřích s podnoží, oproti pravokořenným. V listech, které jsou více zastíněné a produkují nejvíce kyseliny jablečné, je intenzita dýchání vyšší (HUBÁČEK, KRAUS, 1982; SCHULTZ, 1993; LEE et al., 2012).

### ***Zálistky***

Během růstu letorostu, v období před a především po kvetení, vyrůstají v úžlabí listů osy druhého řádu, tzv. fazochy neboli zálistky. Rozdíl v morfologické a anatomické stavbě letorostů a zálistků je pouze v jejich rozměrech. Pokud je réva ošetřena krátkým řezem a malým zatížením plodnými očky, zálistky rostou intenzivněji. Také vyšší dávka dusíkatých hnojiv podporuje jejich růst stejně jako vyšší vlhkost půdy. Délka zálistků je rozdílná v závislosti na jejich postavení na letorostu a také na směru růstu hlavního letorostu. Pokud rostou zálistky na vodorovném letorostu, je jejich intenzita růstu vyšší, než na letorostu svislém (PAVLOUŠEK, 2011).

Na počátku vývoje přijímají zálistky produkty fotosyntézy z jiných listů. Významným zdrojem asimilátů se stávají po vytvoření dvou a více plně vyvinutých listů. Pochody jako jsou asimilace, transpirace a dýchání jsou v zálistkových listech intenzivnější než na listech rostoucích na hlavních letorostech. Také pohyb asimilátů v těchto listech je odlišný od hlavních listů. Jakmile zálistkové listy dosáhnou 40 % své konečné velikosti, začnou vytvořené asimiláty odtékat do dalších listů zálistku, případně směrem dolů do květenství nebo hroznů. Když listy fazochů dosáhnou 65 % konečné velikosti, zastaví se do nich přívod asimilátů z jiných částí rostliny. Zálistkové listy vyživují vždy hrozny na té straně hlavní osy, na které samy vyrůstají. Na základě tohoto

zjištění se fazochy vyrůstající na spodní straně letorostů vylamují, aby příliš nezahušťovaly listovou zónu kolem hroznů (KRAUS, 1979). Na zálistcích se mohou také vytvářet květenství a následně hrozny. Tvorba květenství však bývá nepravidelná a většinou se hrozny na zálistcích co nejdříve odstraňují, aby neovlivňovaly jakost sklizně (PAVLOUŠEK, 2011).

### **1.1.3 Celková listová plocha**

Listová plocha má velký význam pro vývoj a růst révy vinné. Asimiláty, které tvoří, vyživují celý keř. Zpočátku se spotřebovávají především na podporu vegetativního růstu, v pozdějších stádiích jsou vyživovány i hrozny a po zakrácení letorostů tzv. osečkování se stávají jejich hlavním příjemcem. Velikost listové plochy je závislá na velikosti čepele a počtu jednotlivých listů na keři. Velikost listové čepele nemusí být závislá pouze jen na odrůdě, ale lze ji ovlivnit také agrotechnickými zásahy. Mezi faktory, které listová plocha révového keře ovlivňuje, patří tvorba sklizně a její jakost, zakládání květenství pro úrodu v nadcházejícím roce, vyzrávání dřeva, růst kořenů (PAVLOUŠEK, 2011).

Důležitou roli v produkci asimilátů v listech hraje také jejich expozice ke slunečnímu záření. Listy, které jsou přímo osvětlené, tvoří tzv. solární listovou plochu a zabírají 30 – 35 % z celkové listové plochy. V listech, které jsou ve stínu, nedosáhne fotosyntetický výkon takové úrovně, aby významně ovlivnily export cukrů a růst révy vinné (KRAUS et al., 1999). Počet listů, které jsou přímo osluněné, se snažíme zvýšit pomocí řezu a vedení. Řezem révového keře se snažíme docílit optimálního pokrytí prostoru listovím. Jako ideální stav se uvádí 2 m<sup>2</sup> listové plochy na 1 m<sup>2</sup> vinice (KRAUS, 2010). Měřením velikosti listové plochy pomocí indexu listové plochy se zabývali BURG a ZEMÁNEK (2010). Pokud je keř ošetřen krátkým řezem a má tedy nízké zatížení, listy na letorostech rostou pomaleji a mají větší plochu čepele. Naopak dlouhý řez při vyšším zatížení způsobí, že letorost bude mít větší počet listů, které vyrostou rychleji, avšak jejich plocha bude menší. V případě, že se vytvoří příliš velké množství listů, dojde k nadměrnému zahuštění keřů a rychle klesá efektivnost listové plochy.

Je však nutno brát ohled na to, že při příliš velké osluněné listové ploše dochází ke snižování účinnosti asimilace. Asimiláty, které jsou v listech produkovány, se

neodvádějí dostatečně rychle a zvyšování jejich koncentrace zpomaluje tvorbu nových. Cílem je tedy zvolení správných agrotechnických zásahů, které mají za následek optimální počet oček na plochu vinice a zabránění snížení jakosti hroznů. PAVLOUŠEK (2011) uvádí, že počet plodných oček je nutné optimalizovat ve vztahu ke vztahu k narůstání cukernatosti. Dle počtu ponechaných oček na letorostu se uvádí 3 úrovně zatížení. Nízké zatížení s počtem 4-6 oček na m<sup>2</sup>, střední zatížení se 6-8 očky na m<sup>2</sup> a vysoké zatížení, u kterého se ponechává 8-10 oček na m<sup>2</sup>. Velikost listové plochy také přímo souvisí s násadou hroznů na keři. KLIEWER a DOKOOZLIAN (2005) tvrdí, že optimální listová plocha na keři je 0,8 – 1,2 m<sup>2</sup> na kg hroznů.

Z pohledu tvorby asimilátů je možné stěnu na keři révy vinné rozdělit na tři zóny:

- Spodní třetina listové stěny, tvořena hlavními listy, jež vytváří asimiláty po celou dobu vegetace. Vrchol aktivity mají v období kvetení a postupně jejich výkon klesá.
- Střední třetinu listové stěny tvoří hlavní i zálistkové listy, tyto produkují nejvíce asimilátů od období kvetení do zaměkání bobulí.
- Horní třetinu listové stěny představují listy zálistků. Ty se v porovnání s hlavními listy tvoří později, proto jejich význam nastupuje až po období zaměkání bobulí, kde přebírají hlavní funkci ve výživě hroznů (PONI, INTRIERI, 2001). V konečných fázích dozrávání hroznů by měla být plocha tvořena zálistkovými listy přibližně o 30 % větší než plocha listů na hlavních letorostech (PAVLOUŠEK, 2011).

#### **1.1.4 Fenofáze kvetení**

Ve srovnání s délkou předchozích fenofází, probíhá kvetení v poměrně krátkém časovém období. Většinou trvá kolem 20 dnů a v našich klimatických podmínkách je optimálním termínem začátek června. Je vhodné, aby průběh kvetení nedoprovázely příliš vysoké a intenzivní srážky, které mají za následek nedostatečné opylování. Výsledkem mohou být hrozny, které obsahují malé množství bobulí (PAVLOUŠEK, 2011).

Základy květenství, kterými jsou v případě révy vinné květní laty, se na letorostech vytváří již v předchozím roce (MULLINS et al., 2003). Celý proces

zakládání květenství je možné rozdělit do tří etap, iniciace, základní diferenciaci a dodatečná diferenciaci.

Iniciace květenství probíhá v paždí listů, kde se vyskytují zimní očka, přesněji tedy v jejich meristematických pletivech. Vlivem osvětlení a teploty dochází k působení růstových látek na meristémy těchto oček (CAWTHON, MORRIS, 1982). Teplota, při které se začínají zakládat květenství je 20 °C, optimální je 30 °C a při teplotě nad 40 °C dochází k výraznému oslabení zakládání. S rostoucí teplotou je zapotřebí také vyšší intenzita osvětlení, při teplotě 25 °C je optimum 3 600 luxů. Při optimální teplotě má zvýšení intenzity osvětlení za následek vytvoření rozměrnějšího základu květní laty, což vede k vytvoření většího hroznu. Poloha oka na letorostu hraje také důležitou roli v zakládání květenství. Pokud je oko na letorostu směrem k vrcholu na 10. a vyšším místě, již nemůže dojít k založení květenství a oko se stává neplodným i přes příznivé podmínky pro iniciaci. Ihned po skončení iniciace probíhá vytváření jednotlivých částí květenství, tato fáze je známa jako základní diferenciaci květenství. Dochází v ní ke zvětšování květního primordia a k diferenciaci částí osy květenství. Tato fáze je ukončena zhruba v polovině srpna, kdy očka vstupují do dormance (endogenního klidu).

Koncem zimy očka vystupují z dormance a nastupují do exogenního klidu, způsobeného nízkými teplotami. V této fázi však v oku dochází k narůstání osy, základů listů a k dodatečné diferenciaci, při které se určí konečná velikost zárodku květní laty. Vyšší teplota v této fázi způsobí, že hrozny budou menší, naopak nižší teplota a pomalé rašení zaručí za vhodných podmínek vytvoření velkých hroznů. Důležitý pro velikost budoucích květenství je také dostatečný přísun vody a živin. Jakmile se však oko dostane na 10. místo v pořadí od vrcholu letorostu, ztrácí možnost založení květenství a stává se tak neplodné (PAVLOUŠEK, 2011).

Samotné kvetení je podmíněno vhodnými klimatickými podmínkami. Teplota, při které dochází k otevírání prašníků, by měla být minimálně 15 °C. Velkou roli hraje také vlhkost vzduchu a srážky, vzhledem k tomu, že otevírání prašníků se děje na principu sesychání stěny pylového vaku, zvýšená vlhkost tento proces zpomaluje (MULLINS et al., 2003). Většina pěstovaných odrůd evropské révy vytváří oboupohlavní květy. Nejčastěji dochází k opylení blizny pylem téhož květu (PRATT, 1971). Pylová zrna uvolněná z prašníků dosedají na bliznu a začíná proces klíčení a růst pylové láčky, ideální teplota pro růst je 25 – 30 °C, příliš nízká teplota velmi zpomaluje

rychlost růstu pylové láčky. Když dorazí pylová láčka až k vajíčku, dochází k oplození, po kterém následuje nasazování bobulí. Jednotlivé bobule vznikají zvětšováním semeníků působením auxinů. V průběhu kvetení však může dojít k tzv. sprchávání, příčinou může být velké množství faktorů a následkem je opadnutí kvítků v různých stádiích kvetení, případně opadnutí malých bobulí (MULLINS et al., 2003).

### **1.1.5 Fenofáze vyžrávání plodů a dřeva, fenofáze dormance zimních oček a období klidu**

Se zralostí plodů úzce souvisí management agrotechnických zásahů ve vinici. Proto je důležité znát změny, které probíhají v hroznech v průběhu zrání (PAVLOUŠEK, 2011). Plodem révy vinné je bobule, která je napojena pomocí stopky na třepinu, tvořící souplodí – hrozen. Třepina představuje 3 – 7 % hmotnosti celého hroznu a obsahuje malé množství sacharidů, kyselin a velké množství fenolických látek (až 20 % z celkového obsahu v hroznu). Délka stopek ovlivňuje rozložení bobulí na hroznu, v případě, že jsou stopky dlouhé a tenké jsou bobule na hroznu rozprostřeny s určitými rozestupy, krátké stopky naopak vytváří kompaktní hrozen. Kompaktnost hroznů je jeden z faktorů, který ovlivňuje citlivost k houbovým chorobám (RIBÉRAU-GAYON et al., 2006). Samotná bobule je tvořena slupkou (exokarp), dužninou (mezokarp a pletivo ohraničující semena – endokarp) a semeny. Bobule může obsahovat až čtyři semena, většinou se ale vyskytuje pouze jedno, případně dvě. Na povrchu semena je vnější a vnitřní obal, který tvoří osemení – testu. Pod ním se nachází nucellus, pletivo, které obklopuje rozvíjející se endosperm a embryo, tvořené dvěma dělohami, epikotylem, hypokotylem a radiculou. Po oplodnění dochází k transformaci pestíku v plod – bobuli. Ze stěn vaječníku (perikarp) se vytvoří slupka a dužnina bobule. Perikarp je tvořen třemi anatomicky odlišnými pletivy: exokarpem, mezokarpem a endokarpem (COOMBE, 1987; CAWTHON et al., 1982).

Exokarp tvoří systém obalových vrstev bobule. Povrch je potažen vrstvou kutikuly (1,5 – 4,0  $\mu\text{m}$ ), která se vytváří 3 týdny po oplození vajíčka. Její tloušťka je odrůdovým znakem, v období dozrávání však dochází k jejímu zeslabování. Na kutikule je hydrofobní voskovitý povlak, který zabraňuje ztrátám vody v bobulích (ROGIERS et al., 2004). Tento povlak je poměrně jemný a může dojít k jeho redukování následkem dopadu dešťových kapek na povrch plodu, obrušováním drobnými částicemi unášenými

větrém, případně setření vzájemným dotykem s jinými bobulemi nebo listy. Slupka, která může tvořit 5 – 18 % celkové hmotnosti bobule, se skládá z vnější vrstvy epidermis a vnitřní vrstvy hypodermis. Tangenciálně protažené buňky slupky obsahují nízké koncentrace cukrů, z kyselin je zastoupena především kyselina citronová, dále obsahují fenolické látky, jako jsou antokyanová barviva u modrých odrůd, taniny a dále aromatické látky (PAVLOUŠEK, 2011).

Mezokarp, u bobulí běžně nazývaný jako dužnina, se skládá z 25 až 30 vrstev tenkostěnných a vysoce vakuolizovaných parenchymatických buněk. Ve zralých bobulích obsahují vakuoly těchto buněk organické kyseliny, cukry a mohou představovat až 99 % celkového objemu buňky. U odrůd nazývaných barvíčky mohou obsahovat stejně jako ve slupce antokyanová barviva. Zatímco buněčné stěny zůstávají v buňkách mezokarpu prakticky nezměněny, v průběhu zrání, složky na bázi polysacharidů jako například celulóza, bývají upraveny, což vede k zaměkání bobulí (OLLAT et al., 2002). Integrita buněk však zůstává zachována díky začlenění rozpustných proteinů (především glykoproteinů) do buněčných stěn (DAVIES et al., 1999). Vnější mezokarp je tvořen pletivou mimo toky periferních cévních svazků, vnitřní mezokarp je v zóně cévních svazků a v období zralosti tvoří téměř dvě třetiny objemu bobule (COOMBE, 1987). Pod mezokarpem se nachází vrstva pletiva nazývaná endokarp, která obklopuje semena. Dužnina bobulí je protkána komplexní sítí cévních svazků, které vznikly z oválných cévních svazků, sloužících původně k výživě semeníku (PRATT, 1971).

#### **1.1.6 Změny cukrů a kyselin v hroznech v průběhu zrání**

Od počátku kvetení se následkem působení hormonů hromadí v bobulích velké množství produktů fotosyntézy. Koncentrace cukrů však v prvních fázích vývoje nepřesahuje koncentraci  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , což odpovídá koncentraci cukrů v listech. Důvodem je intenzivní metabolismus, který sacharidy spotřebovává především pro růst a vývoj semen. V průběhu zrání hroznů se v nich hromadí značné množství rozpuštěných látek, především sacharidů. I v období zvětšování objemu bobulí dochází ke zvyšování koncentrace sušiny, což znamená, že je do bobulí transportována ve větším množství než voda. Zvyšování úbytku vody z bobulí je také způsobeno degradací průduchů v pozdějších fázích zrání. Hromadění cukru se děje proti směru difuzního gradientu,



a dochází tak ke zvyšování osmotického tlaku v bobulích. Sacharidy, které se syntetizují v listech, jsou importovány do hroznů prostřednictvím cévních svazků v lýku. K prvnímu štěpení sacharózy na glukózu a fruktózu dochází na úrovni plazmatické membrány buněk, pomocí enzymu invertázy. Tyto monosacharidy prostupují přes buněčné membrány dovnitř buňky a jsou fosforylovány enzymem hexokinázou, nacházejícím se v cytoplasmě na glukóza-6-fosfát a fruktóza-6-fosfát. Na glukózu-6-fosfát se váže uridintrifosfát a vzniká UDP-glukóza (RIBÉRAU-GAYON et al., 2006). Poté dochází opět k jejich spojení, za vzniku energeticky bohaté molekuly sacharóza fosfátu. Energie nahromaděná v těchto molekulách se uvolňuje působením sacharóza fosfát fosfatázy, vzniká sacharóza, která se ve vakuole opět štěpí na glukózu a fruktózu, které se zde ukládá (ROBINSON, DAVIES, 2000).

Obsah sacharidů v bobulích je ovlivněn také různou intenzitou respirace v průběhu zrání hroznů. V prvních fázích růstu bobulí dochází také ke zvýšení respirace. Její intenzita pak zůstává relativně stabilní až do období sklizně. Zpočátku se na respiraci podílí největším dílem semena a dužnina, později je to slupka bobule. V semenech jsou substrátem pro respirace převážně mastné kyseliny, naopak v dužnině dochází k prodýchávání cukrů a kyselin. Obsahy glukózy a fruktózy nejsou shodné a v průběhu zrání se mění. V zelených hroznech převládá glukóza, které může tvořit až 85 % redukujících sacharidů v hroznech. Její koncentrace se však snižuje následkem zvýšené intenzity dýchání na počátku zrání, protože je jako substrát pro buněčnou respiraci využívána přednostně před fruktózou. V období sklizně se tedy v hroznech nachází přibližně stejné množství glukózy jako fruktózy (RIBÉRAU-GAYON et al., 2006, STEIDL, 2002).

## **Kyseliny**

V hroznech révy vinné se vyskytuje velké množství organických kyselin, nejvyšší zastoupení mají kyseliny vinná a jablečná, které tvoří až 90 % z veškerých kyselin. Obě tyto kyseliny jsou syntetizovány v listech a především v hroznech (RUFFNER, 1983). I přesto, že jsou tyto kyseliny chemicky velmi podobné, jejich metabolické dráhy jsou velmi odlišné. Podíl kyseliny jablečné ke kyselině vinné je značně variabilní a může být ovlivněn podmínkami při zrání hroznů, ale také odrůdou. Literatury, ve které se píše o transportu organických kyselin z listů do hroznů, je velmi omezené množství. Její závěry často nejsou podloženy důkazy o tomto procesu. SKENE

a HALE (1971) zjistili pomocí izotopu uhlíku C14, že bobule hroznů jsou schopné si samy syntetizovat kyselinu vinnou i jablečnou, rozkladem cukrů transportovaných z listů, nebo přítomných v samotných bobulích. SWEETMAN et al. (2009) uvádí, že doposud nebylo zjištěno, zda je veškerá kyselina jablečná syntetizována v bobulích, nebo se určité procento transportuje z listů. LOBIT et al. (2006) tvrdí, že kyselina jablečná v hroznech musí být syntetizována přímo v bobulích, protože pH xylemové mízy se pohybuje v rozmezí 5 až 6 a pH floemové mízy je vyšší než 7, což jsou vyšší hodnoty než pK nejslabší kyseliny jablečné (pK = 5,2). Proto není možné transport kyseliny jablečné těmito proudy, pokud není ve formě konjugované báze například s kationtem draslíku.

Kyselina vinná je vzhledem ke své roli, kterou hraje při udržování chemické stability, barvy a chuti, nejdůležitější kyselinou ve víně. Réva vinná je jediný ovocný druh pěstovaný v Evropě, jehož plody obsahují vysoké obsahy kyseliny L(+)-vinné. Z exotických plodin je zastoupena například v banánech či tamarindu. Její koncentrace v nezralých zelených bobulích může být až  $15 \text{ g.l}^{-1}$ , v období sklizňové zralosti hrozny obsahují kyselinu vinnou v koncentraci  $3,8 - 11,3 \text{ g.l}^{-1}$ . Hrozny vypěstované v severnějších oblastech obsahují vyšší hodnoty kyseliny vinné než v jižních teplejších oblastech (ROBINSON, 2006). Vzniká jako vedlejší produkt metabolismu sacharidů. Jako hlavní meziprodukt při tvorbě kyseliny vinné je považována kyselina askorbová, která je sama obsažena ve zralých hroznech v nízkých koncentracích. Hromadění kyseliny vinné v hroznech, úzce souvisí s intenzivním buněčným množením při růstu hroznů, v této fázi se tvoří nejintenzivněji. V průběhu zrání bobulí stále probíhá syntéza kyseliny vinné, i když v menším měřítku. Z toho důvodu zůstává její koncentrace v bobulích relativně konstantní, i přesto že dochází ke zvětšování objemu bobulí. Ke katabolickým procesům kyseliny vinné v průběhu zrání hroznů prakticky nedochází (RIBÉRAU-GAYON et al., 2006, STEIDL, 2002).

Kyselina jablečná se nachází ve všech živých organismech. Na rozdíl od kyseliny vinné, je velmi aktivním meziproduktem z pohledu metabolismu hroznů. V révě vinné se vyskytuje jako optický izomer kyseliny L(-)-jablečné. V zelených hroznech může být koncentrace kyseliny jablečné až  $25 \text{ g.l}^{-1}$ . V době sklizně obsahují hrozny  $1 - 6,5 \text{ g.l}^{-1}$  kyseliny jablečné.

V temnostní fázi fotosyntézy dochází v zelených částech révy k asimilaci vzdušného oxidu uhličitého na ribulosa-1,5-difosfát a vznik kyseliny fosfoglycerové. Ta dále kondenzuje a vytváří hexózy, může však také dojít k dehydrataci na kyselinu fosfoenolpyrohroznovou. Oxid uhličitý katalyzovaný karboxylázou se váže na tuto kyselinu a vzniká kyselina oxaloctová, která se následně redukuje na kyselinu jablečnou (RIBÉRAU-GAYON et al., 2006). Významná akumulace kyseliny jablečné v hroznech je především ve fázi zeleného růstu, může dosahovat až koncentrací 15 g.kg<sup>-1</sup>. Prekurzorem kyseliny jablečné v hroznech jsou importované sacharidy. Kyselina jablečná tedy vzniká v procesu glykolýzy, v pentózofosfátovém cyklu, případně β-karboxylací. Při zvýšení intenzitě dýchání přebírá kyselina jablečná roli přenašeče energie. Během růstové fáze se fotosyntézou vytvořené sacharidy transformují do kyseliny jablečné, která se zakoncentrovává ve vakuolách buněk perikarpu. V průběhu zrání dochází k inhibici glykolýzy, a proto se kyselina jablečná transportuje z vakuol a využívá se jako zdroj energie pro probíhající procesy (ROBINSON, 2006).

Kyselina citronová je v přírodě hojně rozšířená. Podílí se na celé škále biochemických a metabolických procesů, například Krebsův cyklus. Vyšší koncentrace kyseliny citronové zpomalují růst kvasinek (KALATHENOS et al., 1995). Její koncentrace v hroznech se pohybuje v rozmezí 100 – 300 mg.kg<sup>-1</sup> (STEIDL, 2002)

### ***Vyžrávání plodů***

K růstu a zvětšování bobulí dochází jak v období růstu, tak v období vyžrávání. V některých zdrojích se setkáváme s rozdělením samotného zrání bobulí do tří vývojových fází (PAVLOUŠEK, 2011).

Zvětšování velikosti bobulí se děje rozdílným způsobem. Zpočátku je růst způsoben pouze roztahováním buněk oplodí. Slupka bobule je tvořena jednou vrstvou silnostěnných buněk a 11 – 16 vrstvami tangenciálně protažených buněk. Dužninu tvoří také 11 – 16 vrstev buněk, které jsou protaženy radiálně. Uprostřed bobule se vyskytují největší buňky. Šťáva v bobulích je bezbarvá, pouze u odrůd révy tzv. barvířek, obsahují buňky dužniny barviva. Do období zaměkání bobulí obsahují bobule velké množství chlorofylu a probíhají v nich stejně jako v listech asimilace a dýchání. Později, ve fázi zaměkání, se buňky začínají naplňovat vodou a původní obsah buňky je vytlačován k jejímu okraji. Transport asimilátů z listů do bobulí se začíná zpomalovat

a v listech se ukládají cukry, protože jejich potřeba na průběh metabolických procesů klesá. Buňky se roztahují a zvyšuje se osmotický tlak v celé rostlině. Ve dřevě dochází k ukládání škrobu. Počet hroznů na jednom keři přímo ovlivňuje osmotický tlak v celé rostlině, větší počet hroznů snižuje osmotický tlak a množství škrobu v kořenech a dřevě je nižší, stejně jako obsah cukru v hroznech. Nejvíce cukrů obsahují hrozny, vzniklé z nejdříve vykvetených květů, a které jsou lépe osluněné (KRAUS, 1979).

Kyseliny se v průběhu zrání do bobulí dostávají z listů. V nejvyšší míře jsou zastoupeny kyselina vinná a kyselina jablečná. U keřů s bujným růstem a horším osvětlením listové plochy, obsahují bobule vyšší množství kyselin. Také teplota má významný vliv na poměr mezi obsahem cukrů a kyselin. Při vyšších denních teplotách dochází ke zvyšování obsahu cukrů v bobulích, naopak při nižších teplotách do bobulí prostupuje větší množství molekul kyselin. Zvýšená teplota způsobuje, že jsou buněčné membrány více propustné, takže přes ně prostupují i velké molekuly cukrů. Nižší teploty podněcují vyšší selektivitu membrán, dochází k zadržování velkých molekul cukrů, ale prostupují molekuly kyselin, které jsou oproti molekulám cukrů menší. V průběhu dozrávání hroznů dochází k postupnému odbourávání kyseliny jablečné v bobulích, tento proces výrazně urychluje vyšší teplota. Bobule na keřích rostoucích v sušších oblastech obsahují vyšší množství kyseliny vinné, naopak vlhčí stanoviště způsobují vyšší koncentrace kyseliny jablečné (OUGH, 1992).

### ***Vyzrání dřeva***

Fenofáze vyzrání zelených letorostů probíhá na konci léta, je charakteristické výskytem felogenu, druhotného meristematického pletiva, které se objevuje v lýkové části letorostů. Na povrchu letorostů vzniká kůra nazývaná periderm. Je tvořena třemi vrstvami. Na povrchu ji tvoří vrstva z korkovatělých buněk, neboli suberoderm. Následuje felogen a třetí vrstvu tvoří parenchymatické buňky zvané feloderm, které obsahují velké množství chlorofylu. Pod peridermem se nachází lýková vrstva (floém), kambium, dřevní část a střed letorostu je tvořen dřením. Prvním znakem, který je typický a vizuálně postřehnutelný je změna barvy povrchové borky, která tmavne do hnědé barvy. Výsledný odstín je typický pro každou odrůdu. U vyzrálých letorostů by průměr dřene při rozříznutí neměl zabírat větší část než 60 % celkového průměru réví (KRAUS, 1979).

Počátkem fenofáze dormance a období klidu zimní očka vstupují na počátku srpna do endogenního klidu, dormance. Dochází k zastavení vnitřního vývoje oček, následkem složitých biochemických procesů, které v nich probíhají. Zhruba koncem září dochází k přechodu do vynucené dormance, způsobené kombinací krátkého dne a nízkou teplotou (TROMP et al., 2005; DOKOOZLIAN et al., 1995). Pokud jsou očka v této fázi umístěna do vhodných podmínek pro růst, dochází k jejich vyrašení. Oproti jiným ovocným dřevinám, stačí révě vinné poměrně krátkodobé působení teplot nižších než 7 °C, POUGET (1963) uvádí, že je tato doba v rozmezí 50 – 400 hodin. V období dozrívání dormance dochází k adaptaci oček, při které se vytváří jejich odolnost proti mrazu (HUBÁČEK, KRAUS, 1982). Ta je tedy určena teplotou a vlhkostí v této fázi, ideální je působení průměrně denní teploty – 2°C po dobu 20 – 30 dnů. Odolnost proti zimním poklesům teplot je daná odrudou révy vinné, klimatickými faktory a agrotechnickými opatřeními (PAVLOUŠEK, 2011).

## **1.2 Možnosti regulace listové plochy v průběhu vegetace**

Mezi každoroční ošetření keře révy vinné se řadí tzv. zelené práce, mezi které patří: podlom, zastrkování letorostů do drátěnky, osečkování, vylamování zálistků a odlistění letorostů. Z pohledu intenzity regulace listové plochy mají velký význam především osečkování a odlist'ování letorostů.

Po období kvetení dochází k potenciální konkurenci mezi vegetativním a generativním růstem, oba tyto procesy vyžadují živiny a jejich zásoby se začínají snižovat. Úprava listové plochy může zvýhodnit příjem živin pro dozrávající hrozny. Je prokázáno, že odstranění listů má za následek zvýšení růstu bočních výhonů a zvýšení fotosyntetické aktivity zbývajících listů (PONI, GIACHINO, 2000, PETRIE et al., 2000). Odstranění listů v zóně hroznů umožňuje lepší proudění vzduchu a stěžuje podmínky pro rozvoj houbových chorob. Vystavení plodů slunečnímu záření má také pozitivní vliv na kvalitu hroznů, stimuluje aktivitu invertázy a ukládání cukrů v bobulích. Invertáza štěpí transportní cukr sacharózu, na jednoduché cukry glukózu a fruktózu, které se ukládají v bobulích. Závislost regulace listové plochy na kvalitě plodů však není lineární, keř révy vinné má tendenci ztrátu listové plochy růstem nahrazovat. Důležitým faktorem je také termín odlistění, který má vliv na adaptaci bobulí na sluneční svit. Odlistění provedené brzo po odkvětu má za následek vyšší

odolnost bobulí proti poškození slunečním úžehem. Při pozdějším odlistění jsou bobule k úžehu náchylnější. (CANDOLFI-VASCONCELOS, KOBLET, 1991).

### **1.2.1 Zkracování letorostů – Osečkování**

Tato pracovní operace na vinici, významně ovlivňuje směr toku asimilátů. Jedná se o zkracování horních letorostů, ale také letorostů na jednotlivých stranách listové stěny, čímž se docílí její udržení v přijatelném tvaru. Při přerušení růstu hlavní osy letorostu dochází k podpoření růstu bočních výhonů a zálistků a také k ovlivnění translokace asimilátů v letorostech (PAVLOUŠEK, 2009). Termín osečkování je rozhodující v tom, zda bude podpořena kvalita nebo kvantita hroznů. Čím později je provedeno první osečkování, tím výrazněji je podpořena kvalita hroznů na úkor výnosu. Pokud je osečkování provedeno do 10 dnů po opylení, výrazně se podporuje výnos, tvorba velkých bobulí a hustých hroznů, ovšem za cenu nižší kvality hroznů. Tato tendence stále převažuje na stranu výnosu až do 20. dne po oplození. Po 20 – 30 dnech po oplození dochází ke zpomalení růstu bobulí, takže nedochází díky translokovaným asimilátům k podporování výnosu, ale naopak k tvorbě látek zvyšujících jakost (PAVLOUŠEK, 2011). Snížení listové plochy osečkováním může mít za následek opoždění dozrávání bobulí (INTRIERI, FILIPPETTI, 2009). Důležitým aspektem osečkování je také zkrácení přerostlých letorostů, které mohou přepadávat přes horní dvojdrátí, a stínit tak listům na spodní části listové stěny. Zastíněné listy vykazují zvýšenou intenzitu dýchání, spotřebovávají asimiláty a tvoří vyšší množství kyseliny jablečné. Osečkování také zabraňuje zahušťování listové stěny a vytváření příhodných podmínek pro rozvoj houbových patogenů. V suchých obdobích, kdy je na vinici nedostatek vody, je vhodné provádět osečkování. Zmenšením plochy zelených listů, dochází ke snížení výparu a tedy k regulaci ztrát vody z rostliny. Některé studie ukazují, že snížené množství produkce sacharidů, se projeví také ve snížení sacharidových zásob uložených v kořenech a kmenech (ZUFFEREY et al., 2012) U bujně rostoucích odrůd révy vinné však musíme termín osečkování přizpůsobit jejich aktuálnímu růstu v daném roce. Vyšší srážky mohou způsobit intenzivnější růst letorostů, v tomto případě se osečkování musí provést před přerůstáním letorostů a nečekat na nejvhodnější termín z fyziologického hlediska. Za jedno vegetační období se osečkování provádí 2 až 4 krát, v závislosti na bujnosti růstu zelených částí révového keře. Jednotlivá osečkování se provádí v takových časových intervalech, aby byla co

nejlépe využita asimilační schopnost listů. Fotosyntetická aktivita listů začíná klesat po 30 – 40 dnech jejich růstu, proto je výhodné je na keři ponechat minimálně po tuto dobu (PAVLOUŠEK, 2011).

### 1.2.2 Odlistění v zóně hroznů

V průběhu vegetace jsou hrozny v závislosti na odrůdě více či méně obklopené okolními listy, které mohou hroznům stínit. V moderním vinohradnictví již patří mezi běžné postupy regulace listové plochy v prostoru hroznů. Částečné odstranění listů v této úrovni vede k lepšímu uspořádání listů v listové stěně, k lepšímu oslunění zbývajících listů a provzdušnění v zóně hroznů. V praxi se zpravidla odstraňují zálistky a 1 – 3 listy na letorostu (PAVLOUŠEK, 2011). U odrůd, které vytváří husté olistění, jako je například Tramín červený, Sauvignon, Frankovka, Kerner a jiné, můžeme šetrnou regulací listové plochy v zóně hroznů docílit zlepšení podmínek pro odkvétání květenství (KRAUS, 2005). Větší expozice vnějších vrstev bobule ke slunečnímu záření způsobuje, že se vytváří silnější slupka. Tento jev je však závislý na termínu provedeného odlistění. U lépe osluněných bobulí, také dochází k rychlejšímu osychání po dešti nebo rose, což je pozitivní, protože sušší hrozny jsou méně citlivé na napadení houbovými chorobami. Pokud jsou hrozny vystavené slunečnímu záření, jejich bobule mají přes den vyšší teplotu, než bobule na hroznech, které jsou zastíněné. Vyšší teplota způsobuje vyšší produkci sekundárních metabolitů, které příznivě ovlivňují sensorické vlastnosti vína. Bobule modrých odrůd mohou mít při plné expozici ke slunci teplotu vyšší až o 12 – 17 °C oproti okolnímu vzduchu, u zelených bobulí je tento rozdíl nižší a pohybuje se v rozmezí 7 – 12 °C. Na to jak intenzivně se bobule zahřívají, má vliv také velikost bobulí a tvar hroznu. Velké kompaktní hrozny se zahřívají intenzivněji než malé volně uspořádané. Bobule, které jsou menší, se ohřívají méně než velké (PAVLOUŠEK, 2011). CORTELL et al. (2007) ve svých studiích uvádí, že v bobulích, které mají vyšší teplotu, se vytváří vyšší množství fenolických sloučenin. Odstranění listů v zóně hroznů také ovlivňuje ukládání cukrů v bobulích. Sacharidy jsou transportovány z místa produkce do hroznů ve formě sacharózy, ta se štěpí pomocí enzymu invertázy na redukující cukry glukózu a fruktózu a v této formě se zde také ukládají. A právě aktivita tohoto enzymu je stimulována osluněním hroznů. Současně s ukládáním cukrů dochází také k rychlejšímu odbourávání kyselin. V neposlední řadě odlistění zvětšuje prostor pro aplikaci přípravků chemické ochrany, protože hrozny

nejsou tak chráněny listy. Po provedeném částečném odlistění také dochází ke snížení výskytu sesychání třapiny (PAVLOUŠEK, 2011).

Výše zmíněné projevy révy vinné na tento zákrok jsou značně závislé na období, ve kterém samotné odlistění provedeme. Aspektů, které je nutné zohlednit při volbě správného termínu, je velké množství. Mezi zásadní činitele patří klimatické podmínky, vlastnosti stanoviště, orientace řádků ke světovým stranám, vlastnosti dané odrůdy, vývoj počasí v daném roce a v neposlední řadě očekávaná kvalita hroznů. Odlistění je také možné provádět ve dvou etapách, po odkvětu révy vinné se odstraňují listy rostoucí na východní straně listové stěny a v období zaměkání bobulí se odstraňují listy na západní straně (PAVLOUŠEK, 2011).

Odlistování v zóně hroznů je možné provádět v raných termínech, dokonce již před kvetením révy vinné. V této fázi dokáže keř révy vinné velice efektivně kompenzovat ztráty. Po provedeném odlistění dochází ke zvýšení intenzity růstu a během 15 dnů je keř schopen plně obnovit ztrátu listů (PONI, 2008). Díky tomu nedochází ke zpomalení růstu ani intenzity asimilace. V případě, že jsou bobule vystavené přímé expozici ke slunci v ranějších fázích vývoje, vytváří silnější slupku (PETGEN, REBHOLZ, 2004). Odstraňovat listy není vhodné při příliš horkém počasí, silné sluneční záření by mohlo mít negativní vliv na hrozny, které jsou citlivé na sluneční spálu (SMART, 2002). Pokud se provede odlistění v pozdějších fázích zrání hroznů, slupka bobulí již nevykazuje takovou schopnost se přizpůsobit zvýšené intenzitě záření svým zesilováním a otužením (FOX, STEINBRENNER, 2010). Odlistění provedené před kvetením má také vliv na nasazování bobulí na hroznu. Pokud dojde k odstranění většího počtu listů, vytváří se volnější hrozny, ale současně se zhoršuje odkvétání a snižuje se výnos (PAVLOUŠEK, 2011). PRIOR (2006) uvádí, že brzký termín odlistování může mít za následek snížení výnosu až o 20 %, ale současně také zvýšení cukernatosti hroznů až o 5 %. PAVLOUŠEK (2012) sledoval vliv odlistění v různých intenzitách a termínech u odrůd Hibernál a Ryzlink rýnský. Při porovnání jednotlivých jakostních parametrů hroznů (cukernatost, titrovatelné kyseliny, pH) se prokázala jako nejlepší varianta, kde se provedlo odlistění v termínu před kvetením révy. V tomto termínu odlistění hrozny také vykazovaly nejmenší citlivost ke slunečnímu úžehu. Odlistění provedené v polovině června zvyšuje odolnost květenství a hroznů proti napadení padlím révovým (*Erysiphe necator*) a peronosporou



(*Plasmopara viticola*), později provedené odlistění zabraňuje rozšíření především plísní šedou (*Botrytis cinerea*). Pozdější termín odlišťování může mít za následek výrazné snížení cukernatosti hroznů (COOMBE, 1993). Odlistění v zóně hroznů lze tedy považovat, z hlediska ovlivnění jakosti hroznů, za velmi účinný způsob ošetření. Obecně se dá s pozitivním účinkem použít bez výjimek u všech modrých odrůd a u bílých odrůd, které tvoří vyšší množství kyselin (PAVLOUŠEK, 2012).

### 1.3 Biochemické změny v průběhu výroby vína

Víno je tvořeno velkým množstvím látek a sloučenin, z nichž mnohé mají významný vliv na barvu, chuť nebo aromatické vlastnosti tohoto nápoje. Mezi faktory, které ovlivňují charakteristické aroma, patří odrůda, klimatické podmínky, vinohradnické a vinařské postupy, zrání vína a skladovací podmínky. V prvních fázích výroby vína probíhá v moštu primární fermentace neboli alkoholové kvašení, které je do značné míry prováděno jedním nebo více kmeny kvasinek, nejběžnějším druhem je *Saccharomyces cerevisiae*. Sekundární fermentace, nazývaná také jablečno-mléčné kvašení, případně malolaktická fermentace, probíhá často v závislosti na druhu vína, které se vyrábí. Jablečno-mléčnou fermentaci zprostředkovávají bakterie mléčného kvašení. Nejčastěji využívaným a nejvhodnějším druhem je *Oenococcus oeni* (CARR et al., 2002). Díky svým acidofilním vlastnostem dokáže přežít, pro ostatní bakterie, v nepříliš příznivém prostředí, jako je víno. Ostatní druhy bakterií většinou nejsou schopny vydržet ve víně až do konce jablečno-mléčné fermentace, vzhledem k vysoké koncentraci alkoholu (RENOUF et al., 2008). Nedávné studie červených vín však ukázaly, že kmeny *Lactobacillus plantarum* mají potenciál také efektivně provádět odbourávání kyseliny jablečné, při současné produkci látek pozitivních pro aroma červených vín (LERM et al., 2011; BRAVO-FERRADA et al., 2013).

### 1.4 Glykolýza a alkoholové kvašení

V závislosti na aerobních podmínkách jsou kvasinky schopné rozkládat cukry pomocí dvou metabolických drah, alkoholovým kvašením a dýcháním. Oba způsoby začínají stejným způsobem a jsou součástí glykolýzy. Tato série reakcí, ve kterých dochází k přeměně glukózy (fruktózy) na pyruvát, za vzniku ATP, představuje

univerzální dráhu v biologických systémech. Glykolýza probíhá především v cytoplasmě, výjimečně probíhají některé reakce v plastidech. Alkoholové kvašení je identické s glykolýzou s výjimkou posledního kroku. V alkoholovém kvašení se kyselina pyrohroznová rozkládá na etanol a oxid uhličitý (RIBÉRAU-GAYON et al., 2006).

Slovo glykolýza pochází z kombinace dvou řeckých slov *glykos* – sladký a *lysis* rozpad. Tato biochemická dráha, která probíhá v cytoplasmě buněk, je počátečním procesem katabolismu sacharidů ve většině živých organismů. Glykolýza bývá někdy označována také jako Embden-Meyerhoffova dráha podle autorů Gustava Embdena a Otto Fritz Meyerhofa, kteří tento děj z velké části popsali v roce 1940. Kvasinky využívají glykolýzu jako hlavní proces pro rozklad cukrů (BIDAN, BONNEVIALE, 1988). Glykolýza zahrnuje celkem 11 chemických reakcí, při kterých dochází k rozkladu hexóz a uvolňování energie v chemické formě ATP (BARNETT, 2003). V první fázi dochází k transportu hexóz uvnitř buňky prostřednictvím difuze (LAGUNAS, 1993). Vzhledem k tomu, že koncentrace cukrů uvnitř buňky je nižší než ve vnějším prostředí, není k tomuto procesu zapotřebí žádné energie. Procesem glykolýzy vznikají z jedné molekuly hexózy dvě molekuly pyruvátu, čtyři molekuly ATP a jedna molekula NADH. Čistý zisk jsou tedy dvě molekuly ATP, protože dvě molekuly jsou spotřebovány při fosforylaci hexóz. Pyruvát vzniklý glykolýzou mohou kvasinky využít v několika metabolických cestách. Musí však regenerovat  $\text{NAD}^+$  z NADH pro znovuzavedení oxido-redukčního potenciálu buňky pomocí procesu fermentace nebo dýchání.

Kvasinky jsou fakultativně anaerobní mikroorganismy, protože obsahují genetickou výbavu pro metabolizaci cukrů aerobně i anaerobně (BOULTON et al., 1996). Kvasinky tedy spotřebovávají cukry v procesu fermentace a dýchání (RACKER, 1974). Obě tyto dráhy začínají glykolýzou, kde je konečným produktem pyruvát. Ten může být přeměněn na acetaldehyd a oxid uhličitý pomocí enzymu pyruvátdekarboxyláza, dále může být acetaldehyd přeměněn na etanol. Tento proces zvaný alkoholové kvašení probíhá v cytoplasmě. Dochází při něm k regeneraci  $\text{NAD}^+$  spotřebované během glykolýzy a dává kvasinkám zisk pouze dvou molekul ATP (BARNETT, ENTIAN, 2005).

Pyruvát však může být také přeměněn na acetyl-CoA a oxid uhličitý pomocí pyruvátdehydrogenázy. Tato reakce snižuje  $\text{NAD}^+$  na  $\text{NADH}$ . Acetyl-CoA se může následně začlenit do Krebsova cyklu a být přeměněn na oxid uhličitý při produkci několika molekul redukovaných koenzymů ( $\text{NADH}$  a  $\text{FADH}_2$ ). Redukované koenzymy produkované v Krebsově cyklu a v glykolýze jsou později reoxidovány v dýchacím řetězci (BARNETT, ENTIAN, 2005). Tento proces, známý jako dýchání, poskytuje energetický zisk 36 – 38 molekul ATP na metabolizování hexózu. Je tedy pro kvasinky energeticky mnohem výhodnější než kvašení. Pro jeho průběh je však zapotřebí kyslík a příliš vysoká koncentrace cukru ho inhibuje (MORENO-ARRIBAS, POLO, 2009). Přeměna pyruvátu na acetaldehyd nebo acetyl-CoA je tedy klíčovým bodem při regulaci metabolismu kvasinek (RIB'EREAU-GAYON et al., 2000c).

### 1.5 Alkoholové kvašení a růst kvasinek

Alkoholové kvašení je v moštu zprostředkováno především kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*. Dochází při tom k přeměně acetaldehydu na etanol a regeneraci  $\text{NAD}^+$ , spotřebované při glykolýze. Nejprve je pyruvát dekarboxylován na acetaldehyd a oxid uhličitý enzymem pyruvátdekarboxylázou. Koenzymem jsou zde hořčák a thiamindifosfát (HOHMANN, 1996). Poté enzym alkoholdehydrogenáza redukuje acetaldehyd na etanol, současně dochází k regeneraci  $\text{NAD}^+$  z  $\text{NADH}$ . V kvasinkách *S. cerevisiae* existují tři izoenzymy alkoholdehydrogenázy, za konverzi acetaldehydu na etanol je zodpovědný hlavně isoenzym I. Jako kofaktor využívá alkoholdehydrogenáza zinek (HOHMANN, 1996; ZIMMERMAN, 1997). Etanol i oxid uhličitý jsou transportovány z buněk pomocí difúze.

Alkoholové kvašení je však mnohem složitější proces. Současně s alkoholovým kvašením probíhá velké množství dalších biochemických, chemických a fyzikálně chemických procesů. Vedle etanolu vzniká i množství jiných dalších produktů jako jsou vyšší alkoholy, estery, glycerol, kyselina jantarová, diacetyl, acetoin. Poslední dvě zmiňované sloučeniny vznikají využitím kyseliny pyrohroznové kvasinkami. Proces jejich vzniku začíná vazbou pyruvátu a acetaldehydu na thiaminpyrofosfát, což vede ke vzniku  $\alpha$ -acetomléčné kyseliny. Oxidativní dekarboxylací této kyseliny vzniká diacetyl. Acetoin vzniká neoxidativní dekarboxylací  $\alpha$ -acetomléčné kyseliny, nebo redukcí diacetylu. Od začátku alkoholového kvašení kvasinky produkují diacetyl, který se po

ukončení kvašení redukuje na acetoin a 2,3-butandiol. Koncentrace diacetylu je však po ukončení alkoholového kvašení příliš nízká (několik mg v litru vína) na to, aby významně ovlivnila jeho aromatický projev (DE REVEL et al., 1996). Současně také dochází k přeměně dalších látek, které se nachází v moštu, prostřednictvím metabolismu kvasinek. Tyto látky velice významně ovlivňují organoleptické vlastnosti vína (RIBÉRAU-GAYON et al., 2006).

Zpočátku hroznový mošt obsahuje více druhů kvasinek. Biologická rozmanitost těchto druhů závisí na více faktorech, jako jsou odrůda, úroveň zralosti v období sklizně, použité chemické ošetření, klimatické podmínky v průběhu vegetačního období, vývoj houbových napadení, apod. (PRETORIUS et al., 1999). Mezi významné faktory ovlivňující druhové složení kvasinkových populací v hroznovém moštu patří také manipulace s hroznem a hroznovým moštem. Během sklizně, při přepravě, a především ve vinařském provozu může dojít k významnému ovlivnění konečné distribuce kvasinek na počátku alkoholového kvašení (MORTIMER, POLSINELLI, 1999). Některé druhy kvasinek jsou schopné se podílet na průběhu spontánního kvašení i za přítomnosti nízké koncentrace oxidu siřičitého (BELTRAN et al., 2002). Z pohledu vytvořených produktů při kvašení a odolnosti vůči obsahu alkoholu bychom mohli kvasinky rozdělit do dvou skupin, na divoké (apikulátní – odvozeno od zástupce *Kloeckera apiculata*) a ušlechtilé (JACOBSON, 2010). Druhové zastoupení kvasinek se v samotném průběhu kvašení mění, zpočátku převažují kvasinky rodů *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, později jsou to převážně rody *Pichia* a *Metschnikowia* a v konečné fázi nejdůležitější druh *Saccharomyces cerevisiae*, který snáší vyšší obsahy alkoholu (FLEET, 1993). V průběhu kvašení se mohou v moštu, ale i ve víně vyskytovat i kvasinky rodů *Torulospora*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zagosccharomyces* a *Brettanomyces*, které mohou způsobovat některé vady vín (RIBÉRAU-GAYON et al., 2006). Aby nedocházelo k rozvoji nežádoucích kvasinek, je vhodné hroznový mošt ošetřit přídavkem oxidu siřičitého a provést očkování vybraných kmenů kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*). Oxid siřičitý má vysoce selektivní účinek na vývoj jednotlivých kmenů kvasinek. Druh *S. cerevisiae* snáší vyšší koncentrace, než většina ostatních kvasinek, a proto jeho aplikace do moštu napomáhá rozšíření právě tohoto kmenu kvasinek (FLEET, 1993). V dnešní době využívá většina moderních vinařství inokulaci vybraných kmenů suchých kvasinek, aby zaručili

minimální odchylky od očekávaného průběhu alkoholového kvašení. Někteří vinaři, kteří upřednostňují tradiční způsoby výroby vína, však stále využívají spontánního alkoholového kvašení. Zastávají názor, že tyto vína vykazují větší komplexnost.

### 1.5.1 Vývoj kvasinek v průběhu alkoholového kvašení

Zpočátku kvasinky metabolizují cukry a další látky obsažené v hroznovém moštu. Získávají z nich především energii, kterou potřebují na rozmnožování svých populací (RIBEREAU-GAYON et al., 2006). V průběhu prvních hodin nedochází ke zvětšování populací kvasinek, buňky kvasinek potřebují čas na to, aby se přizpůsobily novým podmínkám. Pokud nebyla provedena inokulace, pohybuje se populace kvasinek v počtu okolo  $10^4$  buněk.ml<sup>-1</sup>. Vyšší množství buněk lze zaznamenat v případě, že byly hrozny napadeny šedou hnilobou (*Botrytis cinerea*). Pokud bylo víno naočkováno pomocí vybraných kmenů kvasinek, pohybuje se množství buněk v počtu okolo  $5 \times 10^7$  buněk.ml<sup>-1</sup>. Jakmile dojde k přizpůsobení kvasinek na okolní prostředí, dochází k jejich růstu. Tato fáze, která se nazývá exponenciální, je významně ovlivněna teplotou prostředí, přítomností kyslíku, aminokyselin a dalších živin (REHM, REED, 1983; SABLAYROLLES et al., 1996; OUGH 1964). Exponenciální fáze růstů trvá 3 – 6 dnů a za toto období se zvýší počet kvasinek až na  $10^8$  buněk.ml<sup>-1</sup>. Poté dochází k zastavení růstu kvasinek, protože dochází k vyčerpání potřebných živin. Během této fáze je počet buněk téměř stabilní a může trvat 2 – 10 dnů. Následuje fáze poklesu, kde dochází ke snižování počtu buněk. Důvodem snižování počtu kvasinek je vyčerpání živin, potřebných pro růst a zvyšování produktů alkoholového kvašení jako je například etanol, které jsou pro kvasinky toxické (LAFON-LAFOURCADE et al., 1984). Úspěch alkoholového kvašení závisí na udržení populace životaschopných kvasinek na takové úrovni, aby byly schopné spotřebovat všechny zkvasitelné cukry. V opačném případě vzniká riziko pomalého kvašení.

Pro svůj růst a rozmnožování potřebují kvasinky vhodné prostředí a především dostatečnou výživu pro správnou funkci metabolismu. Hlavní surovinou pro kvasinky je asimilovatelný dusík, jehož optimální koncentrace se pohybuje v rozmezí 150 až 200 mg.l<sup>-1</sup>. Tato hodnota je závislá především na druhu kvasinek, protože se liší v nárocích, ale také v množství rozpuštěných látek v moštu, které mohou s dusíkem vytvářet sloučeniny pro kvasinky nevyužitelné (BRION et al., 1996). Na zdárný průběh

kvašení má tedy významný vliv již ošetřování keřů révy vinné, především dostatečné zásobení dusíkem (BELLY, 2003). Pro přežití ve stresových podmínkách a pro svůj růst potřebují také vitamíny. Nejdůležitější vitamin z pohledu kvasinek je thiamin, který jsou kvasinky schopné v průběhu alkoholového kvašení spotřebovat až v množství 600 až 800  $\mu\text{g.l}^{-1}$  a v případě jeho nedostatku v moštu může docházet k inhibici kvašení (BRION et al., 2014).

### 1.5.2 Vedlejší produkty alkoholového kvašení

Vedle primárních produktů alkoholového kvašení jako je etanol a oxid uhličitý vznikají ještě vedlejší produkty. Diacetyl, acetoin a 2,3 butandiol vznikají při kondenzaci pyruvátu s acetaldehydem, vzniklý acetolaktát se později dekarboxyluje. Pokud je tato dekarboxylace oxidativní, produkuje se diacetyl, pokud není oxidativní, vytváří se acetoin. 2,3-butandiol může vzniknout redukcí acetoinu. Diacetyl a acetoin mají typickou máslovou vůni. I když není produkce těchto sloučenin při alkoholovém kvašení příliš výrazná, jejich koncentrace se může zvýšit účinkem mléčných bakterií. Etanol neboli acetaldehyd – vzniká při alkoholovém kvašení dekarboxylací pyruvátu. Většina acetaldehydu je redukována na etanol, ale malé množství zůstane ve víně. Acetaldehyd má charakteristickou vůni připomínající oxidované víno. Acetaldehyd může také vznikat z etanolu chemickou nebo biologickou cestou (ROMANO et al., 1994).

Kyselina octová je hlavní těkavou kyselinou obsaženou ve víně. Pokud je obsažena ve vyšších koncentracích vydává charakteristický zápach po octu a nepříjemný pocit v ústech. Kyselina octová může být produktem kvasinek, mléčných nebo octových bakterií. Kvasinky produkují obvykle pouze malé množství této kyseliny (0,1 – 1,3  $\text{g.l}^{-1}$ ). Pokud však nastanou problémy při kvašení jeho zpomalením, případně zastavením, tvorba kyseliny octové se zvyšuje (MILLAN, ORTEGA, 1988).

Vyšší alkoholy jsou vedlejším produktem metabolismu aminokyselin. Běžně se nacházejí v koncentracích, které jsou pod prahem detekce, ale mohou být prekurzorem některých esterů, které mají velký vliv na sensorické vlastnosti vína (MORENO-ARRIBAS, POLO, 2009).

Estery jsou syntetizovány z acetyl-CoA a alkoholů. Ve víně se vyskytují dva typy esterů, acetáty vyšších alkoholů a estery mastných kyselin a etanolu. První skupina je syntetizována z acetyl-CoA a vyšších alkoholů. Tyto estery mají specifické vůně po lepidle (ethyl-acetát), banánu (isomylacetát), nebo růži (fenyletanol acetát). Druhá skupina esterů je syntetizována z acetyl-CoA a etanolu. Tyto mají většinou ovocné příjemné vůně. S výjimkou ethyl-acetátu estery pozitivně ovlivňují vůni vína (FLANZY, 1998).

Kyselina jantarová – je z kvantitativního pohledu třetím produktem alkoholového kvašení. Svým obsahem pohybujícím se v rozmezí 0,6 – 1,2 g.l<sup>-1</sup> významně ovlivňuje celkovou kyselost ve víně. Činností kvasinek *S. cerevisiae* vznikají ve víně v nízkých koncentracích ještě další kyseliny, jako jsou: kyselina mléčná, kyselina isovalerová, kyselina izomáselná, mastné kyseliny aj. (SALMON et al., 1987). I když je produkce etanolu nejdůležitější cestou k regeneraci NAD<sup>+</sup>, existuje i alternativní cesta. Tato cesta se nazývá glyceropyruvátové kvašení a jejím konečným produktem je glycerol. Pokud mošt obsahuje vyšší množství siřičitanů, dochází k produkci glycerolu. Siřičitany v kombinaci s acetaldehydem brání alkoholdehydrogenáze v regeneraci NAD<sup>+</sup>. V těchto podmínkách kvasinky potřebují oxidovat NADH alternativní cestou a jediným způsobem je za produkce glycerolu. Hlavní produkt reakce aldoláz dihydroxyacetonfosfát se oxiduje na glycerol-3-fosfát enzymem glycerol-3-fosfátdehydrogenázou. Při této reakci dochází k oxidaci molekuly NADH na NAD<sup>+</sup>. Poté enzym glycerol-3-fosfatáza fosforilyje glycerol-3-fosfát na glycerol. Tento proces spotřebovává ATP (FLANZY, 1998).

Glycerol však nevzniká jen za přítomnosti siřičitanů. Na začátku kvašení potřebují kvasinky velké množství substrátu pro růst. Množení buněk doprovází vysoká aktivita biosyntéz proteinů, lipidů, nukleotidů apod. Pro syntézu většiny těchto biomolekul slouží pyruvát jako substrát. Při anabolických reakcích pyruvátu vzniká deficit NAD<sup>+</sup>, který musí být vyrovnán glyceropyruvátovou cestou. Proto je glycerol produkován především v počátečních fázích alkoholového kvašení, kdy dochází hlavně k narůstání masы kvasinek. Z toho důvodu je glycerol třetí hlavní složkou suchých vín, kde se nachází v koncentracích mezi 6 až 10 g.l<sup>-1</sup>, ve vínech vyrobených z botritických hroznů může být jeho koncentrace dokonce až 20 g.l<sup>-1</sup> (RIB'EREAU-GAYON et al., 2006).

## 1.6 Jablečno-mléčná fermentace

Jablečno-mléčná fermentace je proces, ve kterém dochází k přeměně ostře chutnající kyseliny jablečné, přirozeně se vyskytující v hroznovém moštu, na chuťově příjemnější kyselinu mléčnou. Používá se standardně u červených vín, ale také u některých bílých odrůd (MANSELL, 2009). Kyselina L(-)-jablečná a L(+)-vinná představují více než 90 % z celkových kyselin obsažených v hroznech (BEELMAN, GALLANDER, 1979). *Oenococcus oeni* a další bakterie mléčného kvašení odkyselují víno převedením kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou a oxid uhličitý, což má za následek snížení titrační kyselosti a zvýšení hodnoty pH vína (BOUSBOURAS, KUNKEE, 1971). FARKAŠ (1983) uvádí, že ze 134 gramů kyseliny jablečné vznikne 90 gramů kyseliny mléčné a 44 gramů oxidu uhličitého. Odbouráním 1g kyseliny jablečné dojde ke snížení titrovatelných kyselin asi o 0,5 g kyseliny jablečné. Snížením obsahu kyseliny jablečné ve vína má také za následek zvýšení biologické stability vína, protože již nemůže být využita jinými mikroorganismy (DAVIS et al., 1985). Tento sekundární proces obvykle následuje po alkoholovém kvašení vína, ale mohou probíhat i současně. Dekarboxylace malátu na laktát je katalyzována enzymem (malát dehydrogenáza) bez vzniku jiných meziproductů (NAOURI et al., 1990). Odbourávání kyseliny jablečné je možné využít také u některých bílých vín (suchých), kde může přispět ke zvýšení plnosti a bohatosti chuti. Aby vůbec mohly bakterie ve víně přežít, musí být schopné odolat nepříznivým podmínkám prostředí. Tedy pH nižší než 3,5, vysoká koncentraci etanolu (nad 10 obj. %) a vysoká koncentraci SO<sub>2</sub> (50 mg.l<sup>-1</sup>). Nejvhodnější bakterie, která vykazuje vysokou rezistenci k těmto podmínkám je druh *Oenococcus oeni*, proto je také nejčastěji používaným druhem při jablečno-mléčné fermentaci. Pokud je hodnota pH vína vyšší, mohou přispívat na průběh jablečno-mléčné fermentace také další kmeny jako například *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Pediococcus* (DAVIS et al., 1986; WIBOWO et al., 1985).

Odkyselování vín pomocí jablečno-mléčné fermentace se využívá především v chladnějších oblastech, kde mají vína vyšší obsahy kyselin (až 9 g.l<sup>-1</sup>), než v teplejších oblastech. Vína takto odbouraná mají lepší chuť, aroma a vyšší mikrobiální stabilitu (BARTOWSKY, HENSCHKE, 2004; LIU, 2002). Tento proces je však zapotřebí kontrolovat a řídit. Při nekontrolovaném odbourávání může dojít ke tvorbě látek, jejichž vysoké koncentrace mohou mít negativní vliv na sensorické vlastnosti vína. Především



je to tvorba různých pachutí po kyselině octové, těkavých fenolech nebo myšina. Mohou však také vznikat látky s negativním účinkem pro lidské zdraví například ethylkarbamát a biogenní aminy (ZHANG et al., 2006).

Bakterie mléčného kvašení nevyužívají ve svém metabolismu Krebsův cyklus na získání energie, namísto toho fermentují sacharidy procesem substrátové fosforylace. Schopnost metabolizovat kyselinu L-jablečnou je specifická pro jednotlivé druhy i kmeny bakterií mléčného kvašení (SIEIRO et al., 1990; VAILIANT et al., 1995; ZAPPAROLI et al., 2004). Kromě dopadů na kyseliny, mohou bakterie mléčného kvašení metabolizovat další prekurzory, které vznikají ve víně během fermentace a změnit tak složení vína, což vede ke zvýšení složitosti vůní a chutí ve víně. Názorným příkladem je produkce diacetylu. Ale i tvorba esterů, alkoholů a jiných karbonylových sloučenin, může vést k máslovým, ovocným, pikantním, vanilkovým, případně kouřovým projevům (SWIEGERS et al., 2005). Na základě těchto zjištění jsou pro inokulaci vybírány takové bakterie, aby mimo účinnou přeměnu kyseliny jablečné, udělovaly vínu požadované smyslové vlastnosti. Různé kmeny bakterií, vyskytující se v přírodě i komerčně dostupné, vykazují různé vlastnosti z hlediska metabolických produktů (MALHERBE et al., 2012). Proto se v posledních letech této problematice věnuje velké množství studií, s cílem rozplést složité interakce mezi bakteriemi mléčného kvašení a vinným prostředím a získané zkušenosti využít k optimalizaci tohoto procesu. Jablečno-mléčná fermentace může být, z pohledu vinaře, jedním z nejproblematictějších procesů při výrobě vína. I přesto je to proces velice důležitý vzhledem k jeho vlivu na kvalitu a mikrobiální stabilitu vína. Pochopení jakým způsobem pracuje a jak by se dal tento proces optimalizovat, hraje ve výrobě vína velkou roli. Nárůst studií v této oblasti v posledních letech naznačuje, že změny, které se v průběhu jablečno-mléčné fermentace dějí, jsou složitější, než se původně domnívalo (SUMBY, 2014).

### **1.6.1 Bakterie mléčného kvašení**

Všechny bakterie, které se podílí na jablečno-mléčné fermentaci, mají schopnost produkovat kyselinu mléčnou pomocí metabolismu cukrů a kyseliny L-jablečné. Některé druhy bakterií zpracovávají cukry přes homofermentativní dráhy, takže produkují pouze jeden produkt, ve většině případů kyselinu mléčnou, jiné bakterie

využívají heterofermentativních drah a produkují ještě další sloučeniny, jako jsou oxid uhličitý, etanol, kyselina octová aj. (JACOBSON, 2010).

Mléčné bakterie se přirozeně vyskytují na slupce hroznů, ale také v sudech a nádobách určených na uskladnění vína. Všechny rody zastoupených bakterií, mají podobnou buněčnou organizaci, ale rozdíly v jejich fyziologii určují jejich specifické vlastnosti, které mají vliv na kvalitu vína (RIB'EREAU-GAYON et al., 2006). Bakterie jsou prokaryotické buňky s jednoduchou organizací. Od eukaryotických kvasinek se liší především velikostí (jsou menší) a absencí jádra. Buněčné stěny gram pozitivních bakterií se skládají z peptidoglykanu, který se nachází pouze u prokaryot. Tento polymer tvořený sítí polysacharidových řetězců spojených peptidy obaluje bakteriální buňku. Osu tvoří deriváty glukózy: N-acetylmuramová kyselina a N-acetylglukosamin. Ty jsou umístěny střídavě po celé délce řetězce a spojené glykosidickými vazbami. Buněčné stěny bakterií mléčného kvašení mohou obsahovat také ribitol fosfátové nebo glycerol fosfátové polymery, nazývané teichoové kyseliny, které mohou představovat až 50 % celkové hmotnosti buněčné stěny. Pevnost buněčných stěn bakterií je vysoká a dovoluje jim odolávat vysokým osmotickým tlakům (až 20 barů) (RIB'EREAU-GAYON et al., 2006; KÖNIG, FRÖHLICH, 2009).

Plasmatická membrána se nachází pod buněčnou stěnou a vymezuje prostor plasmatického prostoru. Někdy se na ní vyskytují záhyby tzv. mesozomy. U bakterií mléčného kvašení je membrána tvořena dvěma vrstvami lipidů tvořících ventrální hydrofobní vrstvu. K ní jsou připojeny dva druhy proteinů. Periferní proteiny, které jsou připojeny na povrchu pomocí iontových nebo vodíkových vazeb a mají určitou pohyblivost. Integrované proteiny, přichycené pomocí hydrofobních vazeb jsou prakticky nepohyblivé. Membránové lipidy tvoří převážnou část všech lipidů v buňce mléčných bakterií (95 – 99%) a jsou zastoupeny fosfolipidy a glykolipidy (LONVAUD-FUNEL, DESENS, 1990). Plasmatická membrána zastává v buňce bakterií důležitější roli než buněčná stěna. Proteiny v ní obsažené zajišťují základní enzymatické funkce, jako jsou přenosy substrátů a produktů metabolismu a systém ATPázy. Bakterie mléčného kvašení nemají dýchací systém. Selektivní propustnost membrány vytváří transmembránový, elektrochemický protonový gradient mezi vnějším a vnitřním prostředím. Díky tomuto rozdílu se vytváří elektrochemická energie, využitelná při

syntéze ATP. Další z významných vlastností plasmatické membrány je udržení optimálního pH, pro průběh reakcí uvnitř v buňce (RIB'EREAU-GAYON et al., 2006).

### ***Druhy bakterií mléčného kvašení***

Mléčné bakterie vyskytující se při výrobě vína jsou zastoupeny čtyřmi rody: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* a *Pediococcus*. Rozhodujícím faktorem v jejich klasifikaci je jejich homofermentativní nebo heterofermentativní charakter. Homofermentativní bakterie produkují z glukózy více než 85 % kyseliny mléčné. Heterofermentativní bakterie produkují mimo kyselinu mléčnou také oxid uhličitý, etanol a kyselinu octovou.

Rod *Lactobacillus* představuje velmi rozmanitou skupinu gram pozitivních, mikroaerofilních bakterií. Jsou fakultativně anaerobní, jejich buňky mají tyčinkovitý tvar a jsou nepohyblivé. Vyskytují se jako jednotlivé buňky, v párech, nebo v řetězcích různé velikosti. Vyžadují medium bohaté na zkvasitelné cukry. Ve víně se vyskytují čtyři druhy bakterií patřících do této skupiny. *L. breavis* a *L. hilgardii*, které jsou striktně heterofermentativní a *L. casei* a *L. plantarum*, které jsou fakultativně heterofermentativní (MORENO-ARRIBAS, POLO, 2009).

V rodu *Lactobacillus* jsou zastoupeny heterofermentativní i homofermentativní druhy. Všechny druhy, podílející se na výrobě vína, postrádají enzym katalázu, potřebnou k ochraně proti oxidačním procesům, jsou tedy mikroaerofilní. Druhy zastoupeny ve víně jsou *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii subsp. lactis*, *L. diolivorans*, *L. fermentum*, *L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. jensenii*, *L. kunkeei*, *L. leichmannii*, *L. nagelii*, *L. paracasei*, *L. plantarum* a *L. yamanashiensis* (FUGELSANG, 2010).

Většina *Lactobacilů* jsou při výrobě vín nežádoucí, protože produkují vysoké množství těkavých kyselin, zápachy, zákaly, plynů a sedimentů, které mohou zůstat ve víně, především pokud nelze víno zfiltrvat. Některé druhy mohou produkovat vysoké množství kyseliny mléčné, která může ovlivnit smyslové vnímání, např. druh *Lactobacillus plantarum* rozkládá kyselinu vinnou a glycerol na kyselinu octovou, mléčnou a oxid uhličitý (BOULTON, 1996). I přesto se některé vědecké práce zabývají jeho využitím spolu s *O. oeni* při řízení jablečno-mléčné fermentaci (LOPEZ et al.,

2008). Bakterie rodu *Lactobacillus* preferují vyšší pH a tolerují nižší dávky alkoholu než *O.oeni*, proto se přidávají před alkoholovou fermentací (MARGALIT, 1996).

Rod *Oenococcus* dříve známý jako *Leuconostoc* s nejvýznamnějším zástupcem *O. oeni*, se řadí mezi gram-pozitivní nepohyblivé bakterie ve formě koku. Často se vyskytuje v párech, nebo v řetězcích. Je to fakultativně anaerobní bakterie, která roste při pH 4,8 v teplotě od 18 do 30 °C, snáší i obsah alkoholu vyšší než 10 %. Bakterie *O. oeni* fermentují glukózu na kyselinu mléčnou, oxid uhličitý, kyselinu octovou a etanol. Za přítomnosti zkvasitelných cukrů také převádí malát na laktát a oxid uhličitý (MORENO-ARRIBAS, POLO, 2009).

Z rodu *Oenococcus* je nejvýznamnějším druhem při výrobě vína *O. oeni*. (dříve *Leuconostoc oeni*). I přesto, že v názvu obsahuje coc (kok), má tyčinkovitý tvar. Může získávat energii aerobní respirací, ale většinou využívá jako zdroj energie fermentaci. *O. oeni* je bakterie obligátně heterofermentativní, při fermentaci spotřebovává také glukózu za vzniku kyseliny mléčné, oxidu uhličitého, etanolu a kyseliny octové (KANDLER, 1983; PAPAGIANNI, 2012). V redukčních podmínkách, krátce po ukončení alkoholového kvašení, je třetím produktem většinou etanol. Pokud jsou podmínky mírně oxidační, bakterie vytváří jako třetí produkt spíše kyselinu octovou (BOULTON et al., 1996).

Některé kmeny *O. oeni* mohou využít fruktózu za vzniku manitolu, který negativně ovlivňuje jakost vína (BAROŇ, 2011). Jiné kmeny jsou schopné rozkládat arginin, jehož zdrojem jsou mrtvé kvasinky, na amoniak. Mimo hexóz glukózy a fruktózy dokáže většina kmenů *O. oeni* využít také zbytkové pentózy, včetně L-arabinózy, které zůstaly ve víně po kvašení (FUGELSANG, 2010). Bakterie druhu *O. oeni* jsou preferovány vinaři z několika důvodů. Jsou kompatibilní s kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*, pokud se však jablečno-mléčná fermentace spustí současně s alkoholovým kvašením, dochází k vzájemnému soutěžení o nutriční zdroje a to může vést ke zpoždění sekundárního kvašení. Druhým důvodem je tolerance většiny kmenů *O. oeni* k nízké hodnotě pH vína a k poměrně vysokým obsahům alkoholu. Také snáší vyšší hodnoty SO<sub>2</sub> ve víně, v porovnání s ostatními druhy. Ze všech bakterií mléčného kvašení produkuje nejmenší množství biogenních aminů a nejvíce kyseliny mléčné (JACOBSON, 2010).

*Pediococcus* tvoří nepohyblivé bakterie kulovitého tvaru, vyskytují se v párech, tetradách, případně velkých shlucích buněk. Optimální teplota pro jejich růst je 25 – 30 °C a pH 6. Jsou fakultativně anaerobní. Jsou homofermentativní, takže veškerou glukózu metabolizují na kyselinu mléčnou a nekvasí pentózy. Ve víně se vyskytují čtyři zástupci tohoto rodu: *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus*, *P. pentoseceus* (DAVIS et al., 1986; EDWARDS, JENSEN, 1992). Nejčastěji se vyskytují druhy *P. damnosus* a *parvulus*. Všechny druhy rodu *Pediococcus* jsou gram-pozitivní. Některé druhy jsou mikro-aerofilní, některé využívají převážně aerobní dýchání. Metabolizují glukózu do L a DL-laktátu pomocí glykolýzy (ZOECKLEIN, 1999).

V nepřítomnosti glukózy mohou některé druhy rodu *Pediococcus* rozkládat glycerol na pyruvát, ten může být později převeden na diacetyl, acetoin, 2,3-butandiol a další sloučeniny, které mohou nepříznivě ovlivňovat vlastnosti vína (FUGELSANG, 2010). Přítomnost druhů *Pediococcus* při výrobě vína je nežádoucí z důvodu vyšší produkce diacetylu a biogenních aminů, které mohou způsobovat bolesti hlavy. Mnoho druhů z rodu *Pediococcus* také vytváří zápach nebo jiné poruchy ve víně, jako je hořká chuť, pocházející z rozkladu glycerolu na akrolein, který reaguje s fenolickými sloučeninami, za vzniku hořké chuti (BOULTON, 1996).

Byly zaznamenány případy, kdy se zkoumalo použití kvasinek jako alternativy pro mléčné bakterie. Několik druhů rodu *Schizosaccharomyces* spotřebovávají kyselinu L-jablečnou, stejně jako bakterie za vzniku etanolu. První výsledky s druhem *S. pombe* ukazují, že kvasinky produkují nepříjemné pachy a nepříjemné sensorické vlastnosti ve víně, způsobené především tvorbou kyseliny octové. Některé studie uvádí, že využití kvasinek *S. pombe* při správném řízení a v kombinaci s druhem *S. cerevisiae* minimalizuje produkci těkavých kyselin (BENITO et al. 2013). Druh *S. pombe* v porovnání se *S. cerevisiae* produkuje při fermentaci větší množství kyseliny pyrohroznové, který zvyšuje stabilitu barvy u červených vín (BENITO et al. 2012). V posledních letech se provádí experimenty s mutaním kmenem *Schizosaccharomyces malidevorans*, která produkuje menší množství těchto nežádoucích látek (FUGELSANG, EDWARDS, 2010).

### 1.6.2 Metabolismus bakterií v průběhu jablečno-mléčné fermentace

Z pohledu vinařství patří mezi nejdůležitější metabolické aktivity bakterií přeměna kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou. Živným substrátem pro rozmnožování bakterií však mohou být i další látky obsažené ve víně například sacharidy, kyselina vinná, kyselina citronová, glycerol a některé aminokyseliny.

Sacharidy patří mezi jeden z hlavních zdrojů energie pro růst a vývoj mikroorganismů, včetně bakterií. Pokud proběhlo alkoholové kvašení bez problémů, zůstávají ve víně pouze cukry, které nebyly kvasinkami fermentovány. Koncentrace fruktózy a glukózy se pohybuje většinou v řádu stovek  $\text{mg.l}^{-1}$ , vyskytují se zde však ještě pentózy zastoupené xylózou a arabinózou. Tyto zbytkové cukry jsou schopné dodat dostatečné množství energie pro bakterie v počátečních fázích růstu na vytvoření dostatečného množství buněk (GUILLOUX-BENATIER et al., 2000). Produkty metabolismu bakterií, které vznikají rozkladem cukrů, se liší dle toho, zda jsou bakterie homofermentativní, nebo heterofermentativní (RIB'EREAU-GAYON et al., 2006).

U heterofermentativních bakterií dochází převážně k přeměně hexóz na laktát, v menší míře se však tvoří i jiné látky jako jsou oxid uhličitý, kyselina octová a etanol. Na druh produktů metabolismu má vliv přítomnost kyslíku. Zpravidla se tvoří vyšší množství kyseliny octové v prostředí s vyšším obsahem kyslíku a naopak v anaerobních podmínkách se tvoří větší množství etanolu. Homofermentativní bakterie vytváří z cukrů výhradně kyselinu mléčnou.

Bakterie mléčného kvašení rozkládají dvě organické kyseliny ve víně, kyselinu jablečnou a kyselinu citronovou. Při výrobě vína je nejzásadnějším přínosem jablečno-mléčné fermentace dekarboxylace kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou, které probíhá bez vzniku meziproductů. Působením malolaktického enzymu (mleA), který byl poprvé izolován z bakterie *Lactobacillus plantarum* (SCHUTZ, RADLER, 1974). Koenzymy při této reakci jsou  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{NAD}^+$  (NAOURI et al., 1990). Některé bakterie jsou schopné rozkládat i kyselinu vinnou za vzniku kyseliny octové, jantarové a oxidu uhličitého. Tento jev je však vždy nežádoucí. Kyselina octová může vznikat v průběhu jablečno-mléčné fermentace především rozkladem kyseliny citronové a sacharidů, ale také rozkladem kyseliny vinné a oxidací etanolu (RIB'EREAU-GAYON et al., 2006).

Její prahová hodnota pro sensorické vnímání je  $700 \text{ mg.l}^{-1}$ , pokud je její koncentrace vyšší než 1,2 až  $1,3 \text{ g.l}^{-1}$  stává se ve víně velmi nepříjemnou.

Kyselina citronová je ve víně obsažena oproti kyselině jablečné v menším množství. Její koncentrace se většinou pohybuje v rozmezí  $200 - 300 \text{ mg.l}^{-1}$ . I přesto má důležitou roli v průběhu jablečno-mléčné fermentace. Druhy *L. plantarum*, *L. casei*, *O. oeni* jsou schopné rozštěpit kyselinu citronovou, působením enzymu lyázy na oxalacetát a acetát. Oxalacetát se následně dekarboxyluje na pyruvát, který může být přeměněn na diacetyl, acetoin a 2,3-butandiol (MORENO-ARRIBAS, POLO, 2009). U některých druhů bakterií (*Lactobacillus*) může docházet namísto pyruvátu k tvorbě kyseliny jantarové a mravenčí.

Diacetyl vykazuje charakteristickou máslovitou vůni, která má v koncentracích okolo  $5 \text{ mg.l}^{-1}$  velmi pozitivní vliv na sensorické vlastnosti vína. Prahové hodnoty smyslového vnímání se pohybují od  $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$  ve víně Chardonnay,  $0,9 \text{ mg.l}^{-1}$  u Rulandského modrého po  $2,8 \text{ mg.l}^{-1}$  u odrůdy Cabernet Sauvignon. Intenzita aromatických projevů acetoinu a butandiolu je mnohem nižší (OSBORNE, EDWARDS, 2005). Diacetyl může být produkován také činností kvasinek v průběhu alkoholového kvašení při metabolismu aminokyselin (DE REVEL et al., 1989), jeho koncentrace je však dvou až tří násobně vyšší ve vínech s jablečno-mléčnou fermentací (SHIMAZU et al., 1985). Kyselina citronová je metabolizována pomaleji než kyselina jablečná, proto na konci jablečno-mléčné fermentace zůstává ve víně v koncentracích  $0,15 \text{ g.l}^{-1}$  i vyšších. V literatuře se uvádí dvě možné cesty syntézy diacetylu v průběhu jablečno-mléčné fermentace. V první je diacetyl výsledkem reakce acetyl CoA s acetaldehydem. Předpokladem druhé cesty je vznik  $\alpha$ -acetolaktátu ze dvou molekul pyruvátu, který se následně dekarboxyluje na acetoin. Diacetyl vzniká jeho oxidací v aerobních podmínkách (RIBÉRAU-GAYON et al., 2006).

Sloučenina 2,3-pentandion vzniká v průběhu jablečno-mléčné fermentace, výše zmíněné karbonylové sloučeniny se mohou vytvářet již při alkoholovém kvašení pomocí kvasinek. Ve víně má charakteristické máslové aroma a jeho prahová hodnota je  $0,9 \text{ mg.l}^{-1}$  (DE REVEL et al., 2000). Zatímco 2,3-pentandion vzniká oxidací diacetylu, při redukci diacetylu mléčnými bakteriemi vzniká acetoin (MARTINEAU et al., 1995),

Většina studií zabývajících se interakcemi mezi fenolickými sloučeninami a bakteriemi mléčného kvašení se odkazuje na metabolismus hydroxyskořicových kyselin (ferulová a kumarová kyselina), za vzniku těkavých fenolů (GURY et al., 2004). Tyto deriváty mohou mít významný vliv na aroma vína, protože jsou vzhledem k jejich nízkému prahu detekce ve víně považovány za zdroj fenolických pachutí (MORENO-ARRIBAS, POLO, 2009). Jejich příčinou je vinylfenol, který vzniká rozkladem fenolových kyselin působením enzymů obsažených v bakteriích (*Pediococcus*, *Lactobacillus*). V červených vínech je však prakticky nedetekovatelný, protože velmi snadno reaguje s antokyany (KUMŠTA, 2007).

Bakterie mléčného kvašení mohou mít také vliv na barvu červeného vína po jablečno-mléčné fermentaci. Antokyanová barviva vytváří komplexy s látkami, které se vyskytují ve víně, především s kyselinou kumarovou, kávovou, katechinem a quercetinem (BOULTON, 2001). Tyto komplexy mohou být stabilnější než samotné antokyany. Řada antokyanových barviv také vzniká z metabolitů kvasinek jako je acetaldehyd a kyselina pyrohroznová (MORATA et al., 2003). Vědecké studie potvrzují, že některé kmeny bakterií (*Lactobacillus*) jsou schopné rozkládat acetaldehyd, který je důležitý při vytváření červené barvy ve víně (OSBORNE et al., 2000). Bylo také potvrzeno, že kmeny *O. oeni* rozkládají kyselinu pyrohroznovou (ASENTORFER et al., 2003). Dalším způsobem jak by mohly bakterie mléčného kvašení snižovat barvu vína je pomocí adsorpce barviv na stěnách buněk bakterií. Toto tvrzení však vyvrací BURNS a OSBORNE (2013), kteří sledovali vliv mléčných bakterií na degradaci barviv v červených vínech v průběhu jablečno-mléčné fermentace. Potvrdili vliv mléčných bakterií na degradaci barviv u červených vín a uvádí, že tento jev se děje především díky rozkladu acetaldehydu bakteriemi mléčného kvašení. Ztrátu barvy vína může způsobovat také glukosidázová aktivita mléčných bakterií, které hydrolyzují glykosidicky vázané antokyany (LE TRAON-MASSON, PELLERIN, 1998)

### **1.6.3 Vývoj bakterií při výrobě vína**

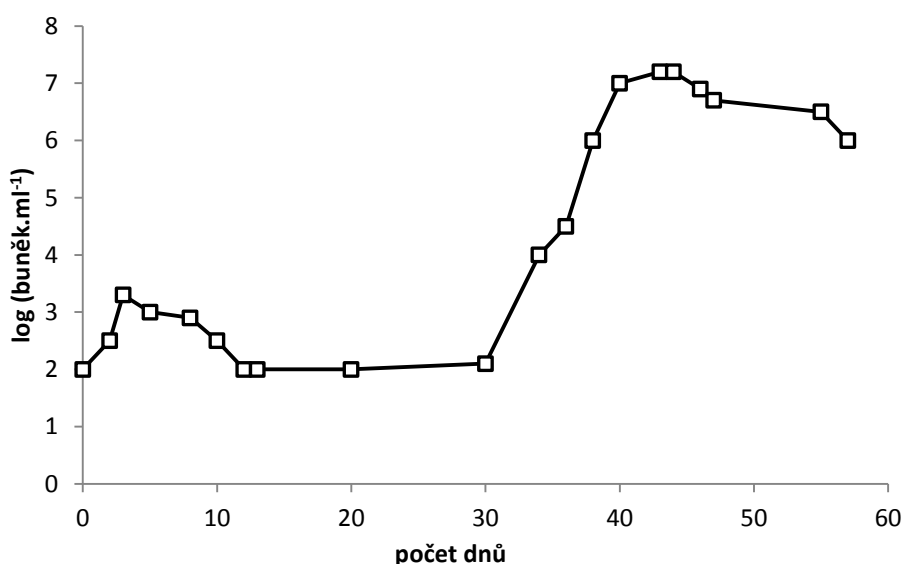
Bakterie mléčného kvašení jsou přítomny ve všech hroznových mošttech i vínech (RIB'EREAU-GAYON et al., 2006). Bakterie se vyskytují na povrchu hroznů a moštu ve velmi nízkých počtech, jsou zastoupeny především druhy *L. plantarum*, *L. casei*,



*L. mesenteroides*, a *O. oeni*. Během období sklizně dochází k vytváření kolonií mikroorganismů ve vinařských provozech, které mohou být zdrojem kontaminace divokých kmenů bakterií. Mimo nádoby jsou to například čerpadla, hadice, stáčecí linky apod. U vín, ve kterých je jablečno-mléčná fermentace nežádoucí (například sladká vína), může nedostatek sanitačních postupů vést k rozvoji nežádoucích bakterií mléčného kvašení a ke vzniku chorob vína. U vín s vyšším obsahem cukru než je  $5 \text{ g.l}^{-1}$  dávají heterofermentativní mléčné bakterie přednost cukru před kyselinou jablečnou a produkují tak množství kyseliny octové. Dřevěné nádoby, ve kterých probíhalo jablečno-mléčná fermentace a kde je téměř nemožné zajistit dostatečnou sanitaci, je vhodné označit a izolovat od sudů nových nebo neurčených pro vína k biologickému odbourání kyselin (MARGALIT, 1996; NIELSEN et al., 1996).

Při řízeném procesu jablečno-mléčné fermentace se využívají selektované kmeny mléčných bakterií. Doporučují se dva možné termíny pro inokulaci. Bakterie mohou být přidány společně s kvasinkami před začátkem alkoholového kvašení, nebo ihned po ukončení alkoholového kvašení. I když je v praxi využívána spíše druhá varianta, má společná inokulace své výhody. Snižuje celkovou délku alkoholového kvašení a jablečno-mléčné fermentace, bakterie se lépe přizpůsobí na zvyšující se obsah alkoholu a dochází k lepší distribuci živin pro kvasinky a bakterie (PAVLOUŠEK, 2010). Bakterie mléčného kvašení prochází při výrobě vína několika fázemi. Na začátku alkoholového kvašení se množství bakterií pohybuje v rozsahu  $10^2$  až  $10^4$  buněk. $\text{ml}^{-1}$ . Pokud jsou klimatické podmínky před sklizní příznivé pro zdraví hroznů, je obsah bakterií na jejich povrchu zpravidla nižší. V prvních dnech alkoholového kvašení dochází k množení kvasinek i bakterií, ale počet bakterií většinou nepřesahuje hranici  $10^5$  buněk. $\text{ml}^{-1}$ . Jejich počet je značně závislý na podmínkách prostředí, především hodnotě pH a obsahu oxidu siřičitého. Po alkoholovém kvašení následuje latentní fáze, kde nedochází ke zvyšování počtu bakterií ve víně. V ideálních podmínkách bakterie mléčného kvašení následují kvasinky, takže jsou již vyčerpané všechny zkvasitelné cukry. V opačném případě může dojít k napadení bakteriemi ke konci alkoholové fermentace a bakterie fermentují cukry za produkce těkavých kyselin. Při růstové fázi dochází k navýšení populace na  $10^7$  buněk. $\text{ml}^{-1}$  i více (FLEET et al., 1984). V tomto množství začíná probíhat jablečno-mléčná fermentace, které pokračuje v průběhu stacionární fáze růstu bakterií. Ve vínech, kde je nižší obsah kyseliny jablečné může být

jablečno-mléčná fermentace ukončena ještě před ukončením růstové fáze. Jakmile dojde k odbourání veškeré kyseliny jablečné, je vhodné urychlit fázi umírání buněk ošetřením vína oxidem siřičitým. Bakterie jsou schopny přežít ve víně i několik měsíců, i když nedochází k jejich namnožení, mohou produkovat nežádoucí metabolity (biogenní aminy, ethylkarabamát apod.), které by mohly vést ke znehodnocení vína. Dostatečná dávka oxidu siřičitého na eliminaci bakterií ve víně se uvádí v rozmezí 30 – 40 mg.l<sup>-1</sup> volného oxidu siřičitého. Tato koncentrace zahubí prakticky všechny bakterie během několika dnů (MORENO-ARRIBAS, POLO, 2009). Populace bakterií v jednotlivých fázích výroby vína znázorňuje obrázek 1.



**Obrázek 1: Vývoj počtu bakterií v průběhu výroby vína od počátku alkoholového kvašení (RIB'EREAU-GAYON et al., 2006)**

Jak již bylo zmíněno, hlavním druhem, který je zastoupený v jablečno-mléčné fermentaci je *O. oeni*. I když snáší vyšší obsahy SO<sub>2</sub> ve víně, nižší hodnota (15 – 20 mg.l<sup>-1</sup>) podpoří růst, stejně tak jako zvýšení teploty na 18 – 22 °C (BAROŇ, 2011). V jednotlivých fázích fermentace dochází ke změnám nejen v počtu jednotlivých bakterií, ale také ve druhovém zastoupení. Na začátku kvašení se v moštu vyskytují druhy rodu *Lactobacillus plantarum*, *L. hilgardii*, *Pediococcus damnosus*, *Leuconostoc mesenteroides*, v pozdějších fázích dochází ke snižování populace těchto druhů a zvyšuje se populace *Oenococcus oeni*, který je tolerantní k vyšším obsahům alkoholu (RIB'EREAU-GAYON et al., 2006).

Obsah živin ve víně často nebývá příhodný pro bezproblémový průběh jablečno-mléčné fermentace. Vysoké, nebo příliš nízké teploty mohou způsobit zpomalení nebo zastavení průběhu odbourávání. Příliš vysoký obsah alkoholu a oxidu siřičitého mohou mléčné bakterie zcela zahubit. Na to, aby průběh fermentace zdárně proběhl, je potřeba dostatečný počet bakterií. Dnešní praxí je, že se mléčné bakterie naočkují přímo do vína ve formě lyofilizovaných kultur (ZHANG et al., 2006). Stejně jako ostatní mikroorganismy, bakterie mléčného kvašení se rozmnožují v příznivých podmínkách, pokud mají dostatek nutričních faktorů, vhodnou teplotu a nepřítomnost toxických faktorů. Všechny hlavní reakce, které probíhají v metabolismu bakterií, jsou zaměřeny na biosyntézu buněčných složek: nukleových kyselin, sacharidů, lipidů, bílkovin. Aby mohly tyto reakce probíhat, potřebují buňky bakterií v prostředí dostatek uhlíku, dusíku a minerálních látek v přístupné formě. Na syntézu výše zmíněných látek potřebují bakterie energii. Tu získávají většinou asimilací různých organických substrátů, cukrů, aminokyselin a organických kyselin. Některé druhy mléčných bakterií jsou schopny získávat energii pomocí buněčné membrány. Ta má dvojí úlohu, zabraňuje volné difuzi mezi buněčným obsahem a okolním prostředím a dochází na ní k výměně protonů a elektronů. Přívod protonů vede k syntéze ATP a naopak odtok protonů energii spotřebovává. U mléčných bakterií dochází při odtoku kyseliny mléčné z buňky současně k odtoku dvou protonů, tento proces nevyžaduje žádnou energii (RIB'EREAU-GAYON et al., 2006; MORENO-ARRIBAS, POLO, 2009).

### ***Živiny, vitamíny a stopové prvky nezbytné pro růst a vývoj bakterií***

Z prostředí, ve kterém bakterie žijí, čerpají především vodu, dále uhlík, dusík, fosfor a síru. Zdrojem uhlíku jsou organické sloučeniny především cukry a kyseliny. Cukry jsou ve víně zastoupeny nejvíce glukózou a fruktózou, dále se mohou vyskytovat manóza, galaktóza, pentóza, rhamnóza a několik dalších disacharidů. Schopnost degradace cukrů závisí na druhu bakterií a okolním prostředí. *Oenococcus oeni* rozkládá snadněji fruktózu než glukózu. Energie získaná v průběhu kvašení cukrů do značné míry zajistí úspěšné zahájení a průběh jablečno-mléčné fermentace. RADLER (1967) uvádí, že na vytvoření dostatečné biomasy bakterií pro zdárný průběh jablečno-mléčného kvašení postačí koncentrace glukózy menší než  $1 \text{ g.l}^{-1}$ .

Asimilovatelný dusík bakterie mléčného kvašení získávají z aminokyselin a peptidů. Přičemž každý druh bakterií má jiné nároky na složení aminokyselin.

Nedostatek aminokyselin se může objevit v průběhu alkoholového kvašení, kdy dochází k růstu kvasinek, na konci kvašení dochází k autolýze kvasinek, které jsou významným zdrojem aminokyselin pro bakterie. Aminokyseliny mohou bakterie využívat pro stavbu vlastních proteinů, nebo mohou sloužit jako zdroj energie. Bakterie mléčného kvašení jsou z pohledu živin pro růst náročné organismy, které si nedokáží syntetizovat všechny složky nutné pro vlastní výživu. Z toho vyplývá, že pokud má být podpořen růst bakterií a zajištěn zdárný průběh jablečno-mléčného kvašení, musí víno poskytovat nutriční potřeby (ZOECKLEIN, 1999).

Z minerálních prvků důležitých pro metabolismus bakterií mléčného kvašení jsou to především  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $K^+$  a  $Na^+$ . Vitamíny slouží jako koenzymy nebo jako prekuzory koenzymů. Bakterie mléčného kvašení si nejsou schopné samy syntetizovat vitamíny skupiny B, zejména kyselinu nikotinovou, thiamin, biotin a kyselinu pantotenovou. Z chemických prvků hraje důležitou roli fosfor, který hraje zásadní roli v kompozici nukleových kyselin, fosfolipidů a při tvorbě ATP. Nedostatek těchto zmíněných minerálů a vitamínů je ve víně spíše výjimkou (MORENO-ARRIBAS, POLO, 2009).

Pokud dojde k inokulaci bakterií ještě před ukončením alkoholového kvašení, hrozí riziko, že si budou kvasinky a bakterie konkurovat v příjmu živin. Na konci alkoholového kvašení je velké množství živin spotřebováno kvasinkami, ty však umírají, klesají na dno ve formě kalu a stávají se samy důležitým zdrojem živin pro bakterie. Na rozdíl od kvasinek si bakterie mléčného kvašení nemohou syntetizovat všechny aminokyseliny z amonných iontů, to je jedním z důvodů proč je jejich aktivita potlačena v době alkoholového kvašení (BAROŇ, 2011). I v suchých vínech, které jsou prokvašeny do sucha, mohou zůstat kvasinkami nezkrasitelné cukry pentózy (arabinóza, ribóza, xylóza), které mohou bakterie využít. Někteří výrobci čistých kultur bakterií mléčného kvašení nabízí i speciálně připravené nutriční přísady pro výživu bakterií (FUGELSANG, EDWARDS, 2010; NIELSEN, 1996).

Před zavedením komplexních doplňků výživy a pokroku v přípravě lyofilizovaných buněk bakterií mléčného kvašení, používali vinaři inokuláty bakterií připravených v laboratorních podmínkách. V roce 1960 bylo zjištěno, že kultury, které se vytvořily v médiích s přidavkem jablečné nebo rajčatové šťávy, vykazovaly lepší účinnost. Tento jev způsobovala přítomnost derivátu kyseliny pantotenové, která je

důležitým růstovým faktorem pro bakterie. Stejně jako u kvasinek, může být kyslík živinou i pro bakterie mléčného kvašení, ale pouze ve velmi omezeném množství a pro mikroaerofilní kmeny druhu *O. oeni*. Nadměrné množství kyslíku naopak inhibuje růst bakterií mléčného kvašení především proto, že zvýhodňuje podmínky pro konkurenční mikroorganismy například bakterie rodu *Acetobacter* (BOULTON, 1996).

#### **1.6.4 Vliv fyzikálně chemických faktorů na růst bakterií**

Růst bakterií mléčného kvašení nejvíce ovlivňují čtyři faktory: pH, teplota, obsah alkoholu a oxid siřičitý. Je velmi obtížné stanovit přesný limit ke každému faktoru, protože se vzájemně ovlivňují. Bakterie například tolerují vyšší dávky alkoholu a oxidu siřičitého ve víně, kde je příznivé pH, nižší pH tuto toleranci snižuje.

##### **Vliv pH**

Hodnota pH má vliv na rychlost růstu každé bakterie, minimum a optimum této hodnoty však není stejné u všech druhů bakterií. Většina bakterií nejlépe rostou v pH, jehož hodnota se blíží neutrálnímu, tedy 7. Bakterie mléčného kvašení však patří do skupiny acidofilních organismů, jsou tedy schopné se aktivně rozvíjet při nízkých hodnotách pH, kolem 3,5. Mohou růst i ve velmi nízkých hodnotách (2,9 – 3,0), ale rychlost růstu je zde silně omezena. Jakmile dosáhne hodnota pH určitého limitu, dochází k zastavení růstu bakterií, tento limit neovlivňuje pouze samotná hodnota pH, ale také druh kyselin v prostředí (MCDONALD et al., 1990). Kyseliny, které pronikají do buňky v nedisociované formě, disociují uvnitř buňky, což má za následek snížení hodnoty pH. Enzymy, které jsou uvnitř buňky, jsou tedy více či méně inhibovány s ohledem na jejich optimální hodnotu pH. Dochází také ke zpomalování hybné síly protonů, což má za důsledek zpomalování transportu živin přes membrány a celkové zpomalení metabolismu celé buňky.

Schopnost adaptace bakterií na kyselé prostředí doposud není známa. Bylo zjištěno, že vína s vyšší hodnotou pH obsahují větší množství bakterií mléčného kvašení a především pestřejší spektrum druhů, než vína s nízkým pH. Tyto vína jsou však mikrobiálně nestabilní, protože některé druhy bakterií mohou produkovat látky, které negativně ovlivní jakost vína. Vyšší hodnota pH také snižuje účinek oxidu siřičitého ve víně. Ke znehodnocení vína může dojít i několik měsíců, dokonce i let po kvašení (RIB'EREAU-GAYON et al., 2006).

Hodnota pH má také vliv na jablečno aktivitu celé buňky. Kmeny *O. oeni* mají optimální hodnotu pH okolo 4. Tyto hodnoty tedy korespondují s hodnotou pohybující se ve vínech. BOUSBOUREAS a KUNKEE (1971) uvádějí, že ve víně, kde byla upravena hodnota pH na 3,15 probíhalo jablečno-mléčné odbourávání 164 dnů a v pH 3,83 odbourávání trvalo pouze 14 dnů. Hodnota pH se také projevuje na tom, jaký substrát pro metabolismus, budou bakterie při fermentaci preferovat. Při testování 400 kmenů bakterií bylo zjištěno, že při hodnotě 3,23 bakterie preferují kyselinu jablečnou a při pH 3,5 preferují rozklad cukrů (BAROŇ, 2011). V řízení jablečno-mléčné fermentace má tedy pH důležitou roli. V některých případech se doporučuje před začátkem odbourávání víno částečně chemicky odkyselit. Tento postup se doporučuje především u vín, kde jsou problémy s nastartováním jablečno-mléčné fermentace. Zvláštní pozornost by měla být věnována moštům a vín, které vykazují vyšší hodnoty pH, aby nedošlo k namnožení nežádoucích kmenů bakterií (ADAMBERG et al., 2003).

### **Vliv oxidu siřičitého**

Oxid siřičitý ve víně je v rovnováze mezi volnou a vázanou formou. Jeho germicidní a antioxidační účinky jsou závislé na složení vína a hodnotě pH. Aktivní je ten oxid siřičitý, který se vyskytuje v podobě molekul ve volné formě. Hodnota pH ovlivňuje účinek oxidu siřičitého velmi výrazně. Abychom zajistili stejný účinek oxidu siřičitého, ve víně s hodnotou pH 3,8, je zapotřebí čtyřikrát vyšší množství volného SO<sub>2</sub> než ve vínech, kde je pH 3,2. Mechanismus působení SO<sub>2</sub> na bakterie je velmi podobný jako u kvasinek. Oxid siřičitý proniká do buňky bakterií prostřednictvím difúze. Dostává se do cytoplazmy, kde reaguje s enzymy, koenzymy a vitamíny, což má za následek zastavení růstu buňky a její smrt. Obecně platí, že bakterie mléčného kvašení mají problémy se vyvíjet v koncentracích celkového SO<sub>2</sub> vyšších než 100 mg.l<sup>-1</sup> a 10 mg.l<sup>-1</sup> volného (RIB'EREAU-GAYON et al., 2006). K inhibici mléčných bakterií může dojít také prostřednictvím SO<sub>2</sub> vyprodukovaným kvasinkami (BAROŇ, 2011).

### **Vliv teploty**

Teplota má obecně vliv na růst všech mikroorganismů, urychluje chemické i biochemické reakce. Bakterie mléčného kvašení v laboratorních podmínkách vykazují růst v rozmezí teplot 15 až 45 °C. Nejvyšší růst však vykazují v rozmezí 20 – 37 °C. U druhu *O. oeni* je toto optimum od 27 do 30 °C. Obsah alkoholu v prostředí však snižuje optimální teplotu, proto je ve vínech její hodnota od 20 do 23°C. Teplota nad

25 °C zpomaluje průběh jablečno-mléčné fermentace a především zvyšuje riziko bakteriálního znehodnocení a zvýšení obsahu těkavých kyselin. Naopak snížení teploty na 10 – 15 °C zastaví množení bakterií, avšak nezničí samotné bakterie, odbourávání tedy dále probíhá, ale jeho rychlost se výrazně zpomaluje. Doba, za kterou dojde k odbourání veškeré kyseliny jablečné, může trvat 5 dnů až několik měsíců (ADAMBERG et al. 2003; RIB'EREAU-GAYON et al., 2006).

### **Vliv etanolu**

Bakterie mléčného kvašení jsou citlivé na obsah etanolu v prostředí stejně jako většina mikroorganismů. V laboratorních podmínkách dochází k inhibici bakterií při koncentraci etanolu 8 – 10 % obj. Závisí však na druhu, rodu a na množství bakterií (RIB'EREAU-GAYON et al., 1975). Pokud se však bakterie vytvoří a rostou ve víně, je jejich tolerance k etanolu vyšší, pravděpodobně proto, že se v průběhu růstu lépe přizpůsobují okolním podmínkám. V takovém případě jsou bakterie druhu *O. oeni* schopné přežít koncentrace etanolu nad 13 – 14 % obj. Některé druhy rodu *Lactobacillus* jsou schopné přežít ve víně o koncentraci alkoholu 16 – 20 % (ARENA, de NADRA, 2005).

### **Vliv ostatních sloučenin**

Vliv fenolických látek na růst bakterií mléčného kvašení zatím není zcela prozkoumán. Spolu s ostatními složkami ve víně mohou mít pozitivní i negativní účinky na růst mléčných bakterií. Bylo zjištěno, že polyfenoly průběh odbourávání mléčné kyseliny spíše inhibují. Naopak kyselina gallová, bakterie mléčného kvašení, stimuluje stejně jako kvasinky. Podobný účinek mají i volné antokyaniny, které stejně jako kyselinu gallovou, bakterie rozkládají na zlomek aglykonu a glukózu. V porovnání s předchozími faktory je však vliv fenolických látek zanedbatelný. Reakce bakterií na přístup kyslíku ve víně je různá. Některé bakterie nevykazují žádné odchylky v růstu v závislosti na obsahu kyslíku v prostředí, další rostou více v jeho nepřítomnosti (fakultativně anaerobní), třetí skupina bakterií tolerují přítomnost kyslíku na jeho parciálním tlaku ve vzduchu (mikroaerobní) a nakonec poslední skupina vyžaduje nízkou koncentraci kyslíku pro optimální růst (mikroaerofilní). Není jednoduché přesně určit optimální obsah kyslíku pro růst a vývoj bakterií mléčného kvašení, protože mimo kmen bakterií má významný vliv na jeho potřebu také prostředí. Obecně se jeví, že

omezené větrání po stočení vína, napomáhá nastartovat jablečno-mléčnou fermentaci (ALBERTO et al., 2012; RIB'EREAU-GAYON et al., 2006).



## 2. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo:

- Vyhodnotit vliv agrotechnických zásahů regulujících listovou plochu na látkové složení hroznů
- Zhodnotit vliv velikosti listové plochy keře na obsah cukrů a kyselin v hroznech.
- Zhodnotit změny jakostních parametrů červených vín v průběhu procesu jablečno-mléčné fermentace.
- Porovnat průběh jablečno-mléčné fermentace po inokulaci čistými kulturami mléčných bakterií ve srovnání se spontánním průběhem.
- Experimentálně ověřit hypotézy:
  1. Větší listová plocha na keři révy vinné bude mít za následek vyšší hodnoty rozpustné sušiny v hroznech.
  2. Vyšší hodnoty titrovatelných kyselin budou v hroznech na keřích s největší listovou plochou.
  3. Inokulace vína čistými kulturami mléčných bakterií zkrátí dobu potřebnou na odbourání kyseliny jablečné při jablečno-mléčné fermentaci.
  4. Inokulace vína čistými kulturami mléčných bakterií sníží množství vyprodukovaného diacetylu v průběhu jablečno-mléčné fermentace.

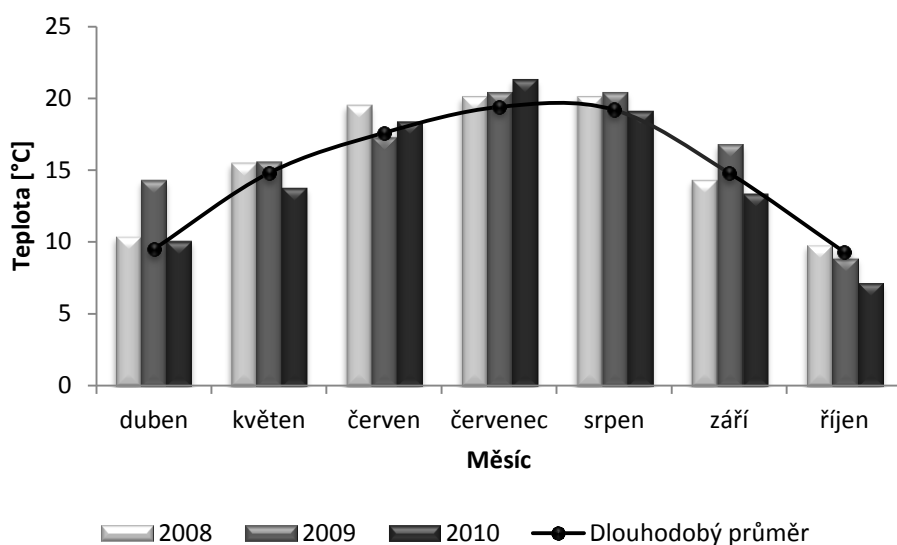
### **3. MATERIÁL A METODIKA**

#### **3.1 Hodnocení vybraných parametrů hroznů v závislosti na velikosti listové plochy révového keře**

##### **3.1.1 Charakteristika stanoviště**

Experimentální pozorování bylo provedeno v letech 2008 – 2010. Všechny vzorky hroznů sledovaných odrůd pocházely z viniční trati Sonberk, řazené do viniční obce Popice v mikulovské vinařské podoblasti. Svah je orientován na jih až jihozápad v nadmořské výšce 210-260 m, půdním druhem je černozem na spraši, dle velikosti částic se jedná o hlinitou zem. Vinice byla vysázena v roce 2004. Keře révy vinné jsou pěstovány na středním vedení s výškou kmene 80 cm. Spon vysázených keřů je 2,4 x 0,9 metru. Všechny odrůdy byly ošetřeny řezem na 1 tažeň bez záložního čípku s 5 – 8 očky. Meziřadí byla ošetřena střídavě zatravněným pásem a černým úhorem.

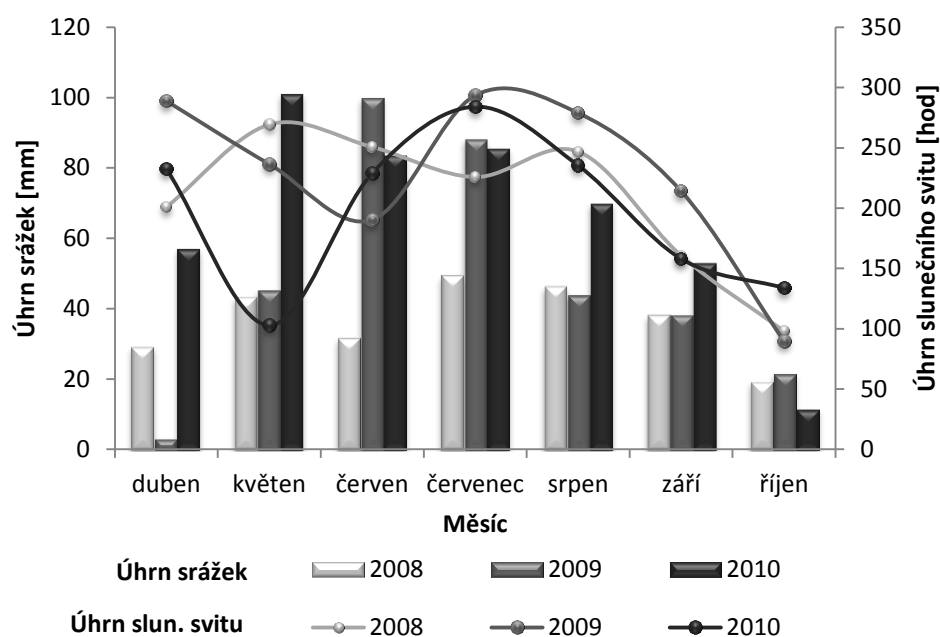
Dlouholetá průměrná teplota na daném stanovišti, v období duben až říjen, je 14,9 °C. Nejchladnějším obdobím v průběhu experimentu byl rok 2010, který vykazoval průměrnou teplotu v tomto rozmezí 14,8 °C. Průměrné teploty v období duben až říjen se v roce 2008 pohybovaly lehce nad průměrem s hodnotou 15,7 °C a nejteplejším byl rok 2009 s průměrnou hodnotou 16,2 °C. Hodnocené vzorky byly odebrány v posledních dvou měsících, tedy v září a říjnu. V roce 2009 byly nadprůměrně vysoké teploty v září (2 °C nad teplotní průměr), ve zbývajících dvou experimentálních letech byly teploty v tomto měsíci pod hranicí víceletého průměru. Měsíc říjen byl teplotně nad víceletým průměrem pouze v roce 2008 a to pouze o 0,5 °C. V roce 2009 byly průměrně říjnové teploty o 0,4 °C nižší než víceletý průměr a nejchladnější byl, stejně jako v měsíci září, rok 2010 (2,1 °C pod víceletým průměrem). Z pohledu teplot v měsících září a říjen lze tedy jako nejteplejší experimentální rok označit rok 2009, průměrné hodnoty byly v roce 2008 a podprůměrně studený byl rok 2010. Hodnoty teplot v jednotlivých měsících jsou znázorněny na Obrázku 2.



**Obrázek 2: Průměrné měsíční teploty v letech 2008 – 2010 na viniční trati Sonberk**

Nejvyšší úhrn srážek byl zaznamenán v roce 2010, kdy v období od dubna do října spadlo celkem 462,2 mm. Vyšší oblačnost v tomto roce měla za následek také nejnižší množství úhrnu slunečního svitu, který byl 1375,7 hodin. Naopak nejvyšší množství slunečního svitu, 1591,8 hodin, bylo zaznamenáno v roce 2009, v roce 2008 byla tato hodnota 1452,1 hodin. Rok 2008 vykazoval také nejnižší srážkový úhrn (257,4 mm), průměrné hodnoty byly naměřeny v roce 2009 (340,8 mm).

Srážkový úhrn v měsíci září byl v roce 2008 a 2009 velmi podobný, lišil se pouze o 0,2 mm. V roce 2010 v tomto měsíci spadlo celkem 53,2 mm, což bylo o téměř 15 mm více než v předchozích letech (38,2 mm v roce 2008 a 38,4 mm v roce 2009). V říjnu byly srážkové úhrny naopak nejnižší v roce 2009, kdy spadlo 11,6 mm. V roce 2008 to bylo 19,3 mm a nejvíce srážek bylo v roce 2009, kdy spadlo 21,7 mm. Podrobné zobrazení průběhu úhrnu srážek a slunečního svitu je znázorněn na Obrázku 3.



**Obrázek 3:** Měsíční hodnoty úhrnu srážek a slunečního svitu v letech 2008 – 2010 na viniční trati Sonberk

### 3.1.2 Sledované odrůdy v letech 2008 - 2010

Volba odrůd v experimentu byla založena na zastoupení odrůd s rozdílnou bujností růstu a tvorbou olistění. Celkem byly sledovány tři odrůdy révy vinné *Vitis vinifera* L.:

**Ryzlink rýnský** – dříve byl vznik této odrůdy přisuzován samovolnému zkřížení plané révy vinné (*Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris*) s některou z místních odrůd v oblasti Porýní. Současné genetické studie však ukazují, že Ryzlink rýnský je pravděpodobně nahodilým křížencem odrůdy Heunisch a semenáče odrůdy Tramín (KRAUS et al., 2005). Listy Ryzlinku rýnského jsou středně velké, mají okrouhlý tvar, povrch je vrásčité zvlněný, značně tuhý a pětilaločnatý, řapík je středně dlouhý. Hrozny jsou malé až středně velké, husté a křídlaté, s válcovitě-kuželovitým tvarem. Hrozny obsahují v klimatických podmínkách České republiky vyšší množství titrovatelných kyselin (10 až 14 g.l<sup>-1</sup>) a spíše nižší cukernatost od 16 do 20 °NM (POSPÍŠILOVÁ et al., 2005). Tato pozdní odrůda vykazuje v průběhu vegetace bujný růst a střední odolnost proti houbovým chorobám (PAVLOUŠEK, 2007; KRAUS et al., 2010). V experimentu byl sledován klon R 2, na podnoži Kober 5 BB, původem z VCR Rauscedo (Itálie).

**Rulandské šedé** – tato odrůda vznikla ve Francii (Burgundsko) jako pupenová mutace odrůdy Rulandského modrého. Listy jsou středně velké, okrouhlé, málo dělené, slabě třílaločnaté s puchýřnatým povrchem a řapíkovým výřezem otevřeným ve tvaru písmene V, řapík je středně dlouhý. Keř této odrůdy má středně bujný růst i olistění, má nižší odolnost proti houbovým chorobám (KRAUS et al., 2005). Hrozen vykazuje v našich podmínkách oproti Ryzlinku rýnskému vyšší cukernatost (19 až 25 °NM) a obsah titrovatelných kyselin v rozmezí 8 až 10 g.l<sup>-1</sup> (POSPÍŠILOVÁ, 2005; PAVLOUŠEK, 2007). V experimentu byl použit klon R 6, podnož SO 4, původem z VCR Rauscedo (Itálie).

**Sauvignon** – původ odrůdy je mapován do francouzského regionu Bordeaux, nebo do vinařských oblastí na řece Loira. Genetické poznatky potvrzují pravděpodobný vznik odrůdy samovolným křížením odrůd Chenin blanc a Tramín. Listy jsou světlezelené, menší až střední, pětilaločnaté, s výraznými výkroji a na okrajích zvlňené. Bazální výkrojek je lyrovitý, řapík je zelené barvy a krátký. Hrozny odrůdy Sauvignon jsou spíše malé, hustě osázené bobulemi ve válcovitém tvaru (KRAUS, 1980). Tato středně raná odrůda vykazuje bujný růst s tvorbou hustého olistění (PAVLOUŠEK, 2007). Odolnost proti houbovým chorobám je nižší, stejně jako mrazuvzdornost. Obsah cukrů v hroznech se v klimatických podmínkách České republiky pohybuje na hodnotách cukernatosti 17 až 20 °NM, obsah titrovatelných kyselin většinou v rozmezí 9 až 11,5 g.l<sup>-1</sup> (PAVLOUŠEK, 2008; POSPÍŠILOVÁ, 2005). Experimentálně byl sledován klon 107, na podnoži Teleki 5C, původem z Německa.

### **3.1.3 Redukce listové plochy na keřích révy vinné**

V průběhu vegetačního období, bylo na sledovaných odrůdách provedeno mechanické osečkování, celkem 2 – 3 krát v průběhu vegetace. Cílem bylo udržet na letorostech rozdílnou velikost listové plochy, v rámci jednotlivých variant. Každá odrůda byla rozdělena na 3 varianty v závislosti na intenzitě zásahu. V experimentu představovala každá varianta 15 keřů dané odrůdy.

U první varianty nebylo provedeno žádné zakracování letorostů po celou dobu vegetace. U druhé varianty bylo provedeno mechanické osečkování přibližně 30 cm nad horním dvojdrátím. U třetí varianty byly letorosty zakráčeny s úrovní horního dvojdrátí. U všech variant bylo provedeno odstranění zálistků od zóny hroznů po 2/3 výšky

letorostů. V průběhu období zrání byly v asi týdenních intervalech odebírány vzorky (3 – 4 krát), které se následně analyzovaly. První vzorky se začaly odebírat, jakmile se cukernatost hroznů na keři přibližovala hodnotě 18 °Bx. Výjimkou byla odrůda Ryzlink rýnský, která ve většině případů nedosahovala v prvních termínech takových hodnot rozpustné sušiny.

Z každé varianty bylo odebráno vždy 100 bobulí, aby byl vzorek dostatečně reprezentativní, byly vybírány z osluněných i zastíněných částí hroznů. Bobule byly následně podrceny a volně odtékající mošt byl analyzován. Vzorky, které nebyly analyzovány v den sběru, byly uchovány v uzavřených plastových nádobách o objemu 100 ml a skladovány při teplotě -18°C.

### **3.1.4 Stanovení velikosti listové plochy keře révy vinné**

Při prvním odběru v každém roce byl vždy zaznamenán počet letorostů na keři, současně také počet dospělých listů na letorostech. Při posledním odběru vzorků v daném roce bylo odebráno vždy 50 dospělých listů od každé varianty, jejichž plocha byla změřena pomocí přístroje CI-202L Area meter (CID, Inc., USA) a vyjádřena v cm<sup>2</sup>.

Na základě zjištěných hodnot byla vypočítána průměrná plocha listu na každou odrůdu, která se vynásobila počtem listů na letorostu a následně počtem letorostů. Výsledkem byla zjištěna průměrná listová plocha na 1 keř vyjádřená v m<sup>2</sup>.

## **3.2 Hodnocení vybraných parametrů červených vín v průběhu jablečno-mléčné fermentace**

### **3.2.1 Použité vzorky vína a mléčných bakterií v roce 2008**

Vzorky vína pocházely od výrobce VÍNO-VÍN Morava, s.r.o. z vinařské oblasti Morava, podoblasti Slovácké obce Strážnice. V experimentu bylo sledováno víno, vyrobené z odrůdy Frankovka. Po proběhnutí alkoholové fermentace bylo víno ošetřeno oxidem siřičitým na hodnotu 15 mg volného oxidu siřičitého na 1 litr vína. Následně bylo víno stočeno do dvou tanků o objemu 1000 litrů, kde došlo k inokulaci čistou kulturou mléčných bakterií rodu *Oenococcus oeni* pro řízenou jablečno-mléčnou fermentaci. První tank byl zaočkován preparátem Lalvin 31 (Scott Laboratories, Inc.,

Petaluma, USA), druhý tank byl zaočkován preparátem BioStart Vitale SK11 (Erbslöh Geisenheim, Německo). Před inokulací měla vína teplotu 30 °C. V následujících 64 dnech od inokulace byly průběžně odebírány vzorky, dokud nedošlo v obou tancích k odbourání veškeré kyseliny jablečné (koncentrace pod 0,1 g.l<sup>-1</sup>). Vzorky byly uloženy v plastových nádobách o objemu 50 ml a zamrazeny na -18 °C a v této teplotě uchovány do laboratorního měření. V průběhu jablečno-mléčné fermentace byla sledována teplota vína.

### **3.2.2 Použité vzorky vína a mléčných bakterií v roce 2009**

V další části experimentu byly použity vzorky dvou mladých červených vín vyrobených z odrůd Frankovka a Merlot. Hned po ukončení alkoholové fermentace byla vína stočena a ošetřena oxidem siřičitým na celkové množství volného oxidu siřičitého 15 mg.l<sup>-1</sup>. Mladá vína byla stočena do třech skleněných nádob o objemu 5 litrů. Vzorky vína byly uloženy do místnosti se stabilní teplotou 20°C.

Víno v první nádobě bylo ponecháno bez inokulace mléčnými bakteriemi. Víno ve druhé nádobě bylo inokulováno preparátem Viniflora Oenos (E. Begerow GmbH & Co. Langenlonsheim, Německo), ve třetí nádobě bylo víno zaočkováno preparátem Viniflora CH35 (E. Begerow GmbH & Co., Langenlonsheim, Německo). V následujících 30 dnech po inokulaci byly průběžně odebírány vzorky, dokud nedošlo k odbourání kyseliny jablečné u všech vín (koncentrace pod 0,1 g.l<sup>-1</sup>). Teplota vín byla zaznamenána u každého odběru.

### **3.2.3 Použité vzorky vína a mléčných bakterií v roce 2010**

V posledním roce byl proveden totožný metodický postup jako v roce 2009. Byly sledovány odrůdy červených vín Cabernet Moravia a Frankovka, z vinařské oblasti Morava. Použité druhy inokulačních preparátů byly Enartis ML Silver (Essecosrl, Trecate, Itálie) a Viniflora Oenos (Chr. Hansen, Horsholm, Dánsko). V průběhu 50 dnů byly odebrány vzorky, celkem v 6 termínech, po 3, 5, 11, 16, 23 a 40 dnech. Při každém odběru byla změřena aktuální teplota vína.

### **3.3 Hodnocení vybraných látkových složek**

#### **3.3.1 Stanovení hodnoty pH a obsahu titrovatelných kyselin**

Pro stanovení hodnoty pH byl použit digitální pH metr OP 122/1 s kombinovanou elektrodou, který byl kalibrován pomocí tlumivých roztoků. Teplota vzorku před měřením byla upravena na 20 °C.

Titrovatelnými kyselinami se rozumí suma sloučenin titrovatelných odměrným alkalickým roztokem do pH 7, nazývané též jako veškerá kyselost vína. Obsah titrovatelných kyselin byl stanoven metodou alkalimetrie. Pracovní postup: 20 ml vzorku bylo titrováno odměrným roztokem 0,1 mol.l<sup>-1</sup> NaOH do pH 7,0. Z množství spotřebovaného NaOH byl vypočítán obsah titrovatelných kyselin vyjádřených jako kyselina vinná (g.l<sup>-1</sup>). U každého vzorku bylo měření provedeno ve 3 opakováních

#### **3.3.2 Stanovení obsahu rozpustné sušiny**

Obsah cukru v moštu byl stanoven na základě měření indexu lomu světla Abbé refraktometrem jako rozpustná sušina moštu vyjádřená ve stupních Brix (°Bx). Každý vzorek byl před stanovením upraven na teplotu 20°C. Každé měření bylo provedeno ve 3 opakováních.

#### **3.3.3 Stanovení obsahu organických kyselin**

Obsahy kyseliny vinné, jablečné, mléčné a citronové v moštu byly stanoveny pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie v izokratickém režimu eluce za použití čerpadla Chrom SDS 150. K separaci jednotlivých analytů byla použita kolona Polymer IEX H-form 10 µm, 250 x 8 mm (Watrex), kde stacionární fází je sulfonovaný styren-divinylbenzenový sorbent, jehož vodíková forma je vhodná na stanovení organických kyselin. Separace na koloně probíhala za konstantní teploty 60 °C, pomocí termostatu Column Oven LCO 102 (ECOM Praha). K detekci organických kyselin byl použit DAD detektor (Thermo) – Spectra System UV 6000 LP, kdy analýza byla provedena při vlnové délce 210 nm. Mobilní fází byla 9 mM kyselina sírová, průtok byl 0,7 ml.min<sup>-1</sup>, běžný provozní tlak v koloně byl 9 MPa.

Úprava vzorků moštu nebo vína před analýzou HPLC: Vzorek moštu nebo vína byl naředěn demineralizovanou vodou v poměru 1:10. Pro odstranění hrubých nečistot



byl naředěný vzorek odstředován po dobu 5 minut při 3500 RPM pomocí odstředivky. Získaný supernatant se přefiltroval přes mikrofiltr s membránou o porozitě 0,45 $\mu$ m. Takto upravený vzorek o objemu 20  $\mu$ l byl dopraven pomocí dávkovací smyčky na kolonu, kde docházelo k separaci. Pro vyhodnocení byl použit software Chromquest<sup>TM</sup> (Thermo Scientific).

### **3.3.4 Stanovení obsahu 2,3-butandionu, 2,3-pentandionu a acetoinu**

Stanovení bylo provedeno na pracovišti VÚPS, a. s., Sladařský ústav Brno. Extrakce vzorků červeného vína byla provedena s použitím SPME vlákna DVB/CAR/PDMS, při teplotě 50 °C po dobu 20 minut.

Analýzy vzorků byly prováděny na plynovém chromatografu Trace GC Ultra Finnigen v kombinaci s hmotnostním detektorem Trace DSQ Thermo Finnigen. K separaci analyzovaných látek byla použita kapilární kolona SLB-5MS (60 m x 0,25 mm I.D, 0,25  $\mu$ m) s následujícím teplotním programem: počáteční teplota 40 °C po dobu 1 min., nárůst teploty 5 °C.min<sup>-1</sup> do 80 °C, setrvání 1 minutu, nárůst teploty 15 °C.min<sup>-1</sup> do 220 °C, setrvání 5 minut. Průtok nosného plynu (He) byl 1,5 ml.min<sup>-1</sup>.

### **3.3.5 Stanovení antioxidační kapacity metodou FRAP**

Principem metody je redoxní reakce, při které dochází k redukci železitých komplexů ferrikyanidu. Redukcí s redukčním činidlem (antioxidantem) vytváří železnaté komplexy s intenzivně modrým zabarvením (BENZIE, STRAIN, 1996).

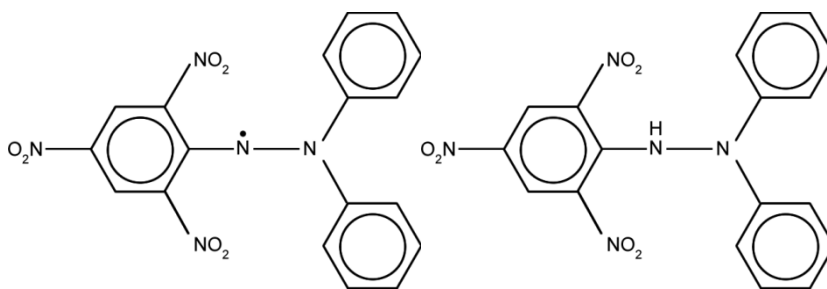
Jako standard byl použit roztok Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina). Potřebná reakční směs se připravila smícháním roztoku FeCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O (0,081 g FeCl<sub>3</sub> ve 25 ml H<sub>2</sub>O), komplexu TPTZ (0,078 g 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazin se rozpustilo ve 25 ml odměrné baňce, s přídavkem 0,08825 ml 35 % HCl a dolilo po rysku deionizovanou vodou) a pufru v poměru 1:1:10. Byla připravena kalibrační řada v takovém rozmezí, aby odpovídala předpokládané hodnotě antioxidační kapacity v naředěných vzorcích.

Pro samotné stanovení byla stanovena absorbance roztoku při vlnové délce 593 nm pomocí spektrofotometru. Roztok byl připraven napipetováním 2000  $\mu$ l reakční

směsi a 25  $\mu\text{l}$  naředěného vzorku (vzorky červených vín byly ředěny 50 x) do 4 ml kyvety s délkou optické dráhy 10 mm. Vzniklá směs byla promíchána na elektromagnetické míchače po dobu 10 sekund a po 10 minutách byl vzorek změřen proti slepému vzorku (reakční směs + deionizovaná voda). Výsledek byl vyjádřen v mmol Trolox equivalent na 1 litr vína ( $\text{mmol TE.l}^{-1}$ ).

### 3.3.6 Stanovení antioxidační kapacity metodou DPPH

Metoda je založena na principu redukce radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl na bezbarvou neutrální molekulu. Difenylpikrylhydrazyl (Obrázek 4) je stabilní syntetický radikál s typickým tmavě fialovým zbarvením. Toto zbarvení je způsobeno nepárovým elektronem na dusíku hydrazylu. Absorpční maximum se pohybuje v rozmezí 515 – 520 nm. Díky své molekulové struktuře je schopen být akceptorem atomu vodíku za vzniku stabilní dimagnetické molekuly difenylpikrylhydrazinu (Obrázek 5) Antioxidační látky ve vzorku reagují s radikálem, redukují ho a snižují jeho zbarvení. Rychlost a rozsah odbarvení jsou úměrné antioxidační kapacitě (účinnosti) analyzované látky (KEDARE, SINGH, 2001).



*Obrázek 4: difenylpikrylhydrazyl*

*Obrázek 5: difenylpikrylhydrazin*

Do kyvety o délce optické dráhy 10 mm se napipetovalo 1900  $\mu\text{l}$  roztoku DPPH, rozpuštěného v metanolu, o koncentraci  $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$  a 100  $\mu\text{l}$  naředěného vzorku (vzorky červených vín byly ředěny 50 x). Směs se promíchala na elektromagnetické míchače po dobu 10 sekund a byla uložena do prostředí bez přístupu světla na 30 minut. Poté byla změřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 515 nm. Jako standardní roztok byl použit Trolox, stejně jako u metody FRAP, výsledek byl vyjádřen v mmol Trolox equivalent na 1 litr vína ( $\text{mmol TE.l}^{-1}$ ).

### 3.3.7 Stanovení obsahu alkoholu

Alkohol ve vzorcích byl stanoven destilací vodní parou, pomocí poloautomatického analyzátoru AP01 (1-CUBE s.r.o.). Na analýzu bylo použito 100 ml vzorku. Obsah alkoholu (% obj.) v získaném destilátu byl odečten na cejchovaném lihoměru při teplotě 20 °C.

### 3.3.8 Stanovení barevných změn

Barevné změny v červených vínech byly sledovány měřením transmitance na přístroji Lovibond RT850i. Výsledná barva byla definována jako barevný prostor  $L^* a^* b^*$  (CIELAB). Hodnoty  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  byly vypočteny dle následujících vztahů:

Jasová hodnota  $L^*$

$$L^* = 116 \left( \frac{Y}{Y_n} \right)^{\frac{1}{3}} - 16$$

Odstínové souřadnice  $a^*$  a  $b^*$

$$a^* = 500 \left[ \left( \frac{X}{X_n} \right)^{\frac{1}{3}} - \left( \frac{Y}{Y_n} \right)^{\frac{1}{3}} \right] \quad b^* = 200 \left[ \left( \frac{Y}{Y_n} \right)^{\frac{1}{3}} - \left( \frac{Z}{Z_n} \right)^{\frac{1}{3}} \right]$$

kde:

X, Y, Z jsou trichromatické hodnoty daného vzorku pro 2° pozorovatele.  $X_n$ ,  $Y_n$ ,  $Z_n$  jsou trichromatické hodnoty X, Y, Z pro dokonale odrážející povrch (bílý standard) pro 2° pozorovatele.

Vzorky vína byly měřeny v plastových kyvetách o délce optické dráhy 2 mm. Pro vyhodnocení byla použita programová aplikace OnColor™ Premium (Lovibond).

Velikosti rozdílů mezi barevnými změnami jednotlivých vzorků byly vyjádřeny pomocí barevné diference  $\Delta E^*_{ab}$  v barevném prostoru  $L^* a^* b^*$ , jež udává velikost diference, ale ne její směr, je definována následujícím vztahem:

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

kde:

$\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  a  $\Delta b^*$  jsou rozdíly těchto hodnot mezi předlohou a srovnávaným vzorkem.

### **3.4 Použité statistické metody**

Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu STATISTICA 12. Pomocí statistických operací byly zjištěny průměry a směrodatné odchylky ze třech paralelních stanovení. Na potvrzení homogenity rozptylů byl použit Cochran, Hartley, Bartlett test. Na potvrzení průkazného rozdílu mezi hodnotami byla zvolena metoda vícenásobné analýzy s následným využitím Tukeyova HSD testu na hladině významnosti  $p = 0,05$ . Jednotlivé statistické analýzy jsou umístěny v Přílohách práce.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Hodnocení velikosti listové plochy

Na základě měření plochy listů v jednotlivých letech byla zjištěna průměrná velikost listů pro danou odrůdu. Plocha dospělého listu odrůdy Ryzlink rýnský měla průměrnou hodnotu  $(208,9 \pm 27,1) \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ . Menší plochu listů u odrůdy Ryzlink sledoval REYNOLDS et al. (1994), který uvádí hodnoty od  $(114,4 \text{ do } 129,8) \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ . Naopak větší listy  $(254,8 \text{ až } 328,9) \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$  u této odrůdy uvádí ve své práci STOLL (2013). Velmi podobných velikostí dosahovaly listy odrůdy Rulandské šedé  $(191,79 \pm 21,6) \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ , listy odrůdy Sauvignon vykazovaly ze všech tří odrůd nejmenší plochu  $(133,19 \pm 24,8) \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ , téměř stejnou plochu listu uvádí ve své práci KAČMÁROVÁ (2011). Rozdíly mezi velikostí listů v jednotlivých letech, znázorněné v tabulce 1, nebyly příliš výrazné.

*Tabulka 1: Průměrná plocha listu sledovaných odrůd révy vinné v letech 2008 - 2010*

Rok Pozorování	Plocha dospělého listu [m <sup>2</sup> ]		
	Ryzlink rýnský	Sauvignon	Rulandské šedé
<b>2008</b>	$(211,9 \pm 29,8) \cdot 10^{-4}$	$(125,6 \pm 23,6) \cdot 10^{-4}$	$(189,7 \pm 29,4) \cdot 10^{-4}$
<b>2009</b>	$(209,4 \pm 27,5) \cdot 10^{-4}$	$(134,4 \pm 26,3) \cdot 10^{-4}$	$(195,9 \pm 14,0) \cdot 10^{-4}$
<b>2010</b>	$(205,5 \pm 23,9) \cdot 10^{-4}$	$(139,7 \pm 25,6) \cdot 10^{-4}$	$(189,8 \pm 17,4) \cdot 10^{-4}$

I když se počet letorostů na keřích pohyboval v rozmezí od 6 do 10, průměrně měla každá varianta 8 letorostů na jednom tažni. Velikost listové plochy však byla různá v rámci jednotlivých odrůd. Důležitým faktorem na výslednou hodnotu byla samozřejmě plocha listu, ale také rozdílný počet listů na letorostech. Nejvyšší plochy listové stěny dosahoval Ryzlink rýnský, který vykazoval nejintenzivnější růst a současně největší plochu listů ze všech sledovaných odrůd. Růst listové plochy odrůdy Sauvignon byl také bujný, avšak vzhledem k poměrně malé ploše listů byla u této odrůdy naměřena nejmenší průměrná listová plocha na jeden keř. Jednotlivé velikosti listových ploch jsou znázorněny v tabulce 2. Podrobná data o velikosti listové plochy jsou znázorněny v tabulkách 19 až 23 v Přílohách.

**Tabulka 2: Průměrná velikost listové stěny na 1 keři u sledovaných odrůd révy vinné v letech 2008 - 2010**

Rok pozorování	Varianta	Velikost listové plochy na 1 keř [m <sup>2</sup> ]		
		Ryzlink rýnský	Sauvignon	Rulandské šedé
2008	1.	4,25 ± 0,19 <sup>k</sup>	2,67 ± 0,03 <sup>fgh</sup>	3,03 ± 0,24 <sup>ghij</sup>
	2.	2,61 ± 0,20 <sup>efg</sup>	1,54 ± 0,07 <sup>abcd</sup>	1,97 ± 0,13 <sup>cde</sup>
	3.	1,17 ± 0,07 <sup>ab</sup>	0,99 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,11 <sup>a</sup>
2009	1.	4,82 ± 0,15 <sup>k</sup>	2,90 ± 0,07 <sup>ghij</sup>	3,38 ± 0,37 <sup>ij</sup>
	2.	2,99 ± 0,02 <sup>ghij</sup>	1,71 ± 0,15 <sup>bcd</sup>	1,95 ± 0,17 <sup>cde</sup>
	3.	1,40 ± 0,11 <sup>abc</sup>	1,12 ± 0,05 <sup>ab</sup>	1,14 ± 0,12 <sup>ab</sup>
2010	1.	4,63 ± 0,29 <sup>k</sup>	3,29 ± 0,13 <sup>hij</sup>	-
	2.	2,72 ± 0,15 <sup>fghi</sup>	1,95 ± 0,23 <sup>cde</sup>	2,20 ± 0,23 <sup>def</sup>
	3.	1,39 ± 0,05 <sup>abc</sup>	1,14 ± 0,12 <sup>ab</sup>	1,17 ± 0,17 <sup>ab</sup>

Pozn.: Rozdílná písmena u čísel znamenají statisticky průkazné rozdíly mezi hodnotami na hladině významnosti 0,05

S ohledem na klimatické podmínky v daných letech lze pozorovat zjevnou závislost mezi množstvím srážek a velikostí listové plochy keře. Nejvyšších hodnot dosahovala listová plocha keře u všech sledovaných odrůd v roce 2010. V tomto roce spadlo v termínu od dubna do října největší množství srážek (462 mm). Naopak nejmenší plocha u všech odrůd byla naměřena v roce 2008, kde byl srážkový úhrn nejnižší za sledovanou dobu (257,4 mm).

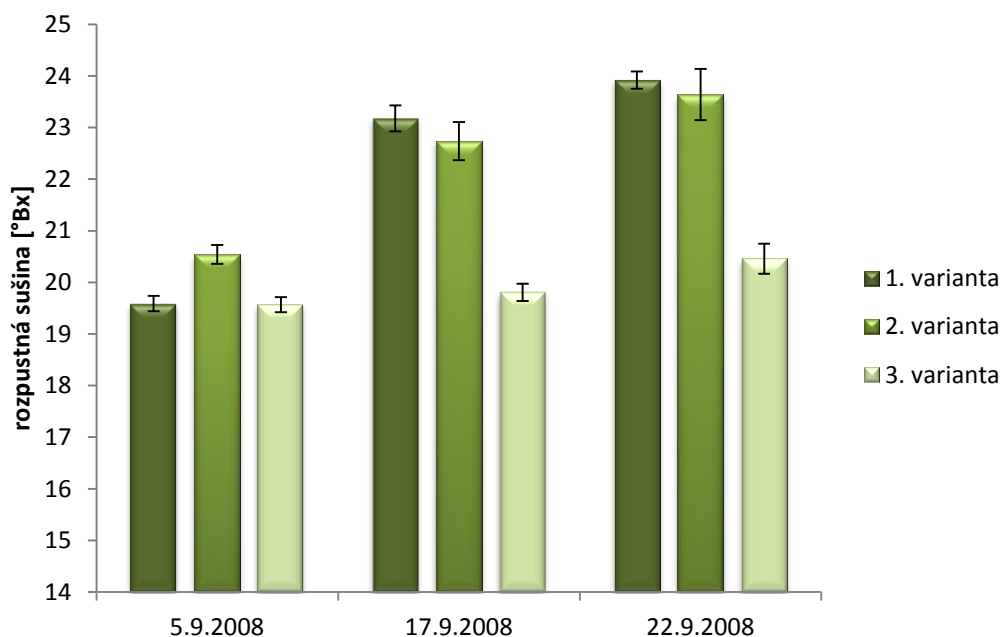
## 4.2 Hodnocení vybraných parametrů hroznů v závislosti rozsahu zakrácení letorostů

### 4.2.1 Vliv velikosti listové plochy keře na obsah rozpustné sušiny v hroznech

#### *Pozorování u odrůdy Rulandské šedé*

Odběr vzorků byl v roce 2008 proveden celkem třikrát v konečné fázi období dozrávání, 5. 9., 17. 9. a 22. 9., který byl současně termínem sklizně. V těchto posledních 17 dnech před sklizní docházelo k růstu obsahu rozpustné sušiny v hroznech u všech sledovaných variant. Nejmenší nárůst byl pozorován u třetí varianty, u které byla ponechána na keřích nejmenší listová plocha (1,02 ± 0,11 m<sup>2</sup> na keř). Statisticky průkazné zvýšení bylo u této varianty zjištěno pouze mezi druhým a třetím odběrem. Hodnota rozpustné sušiny hroznů se mezi prvním a posledním měřením zvýšila pouze o 0,9 °Bx. Podstatně významnější nárůsty, jak lze vidět na obrázku 6, byly sledovány

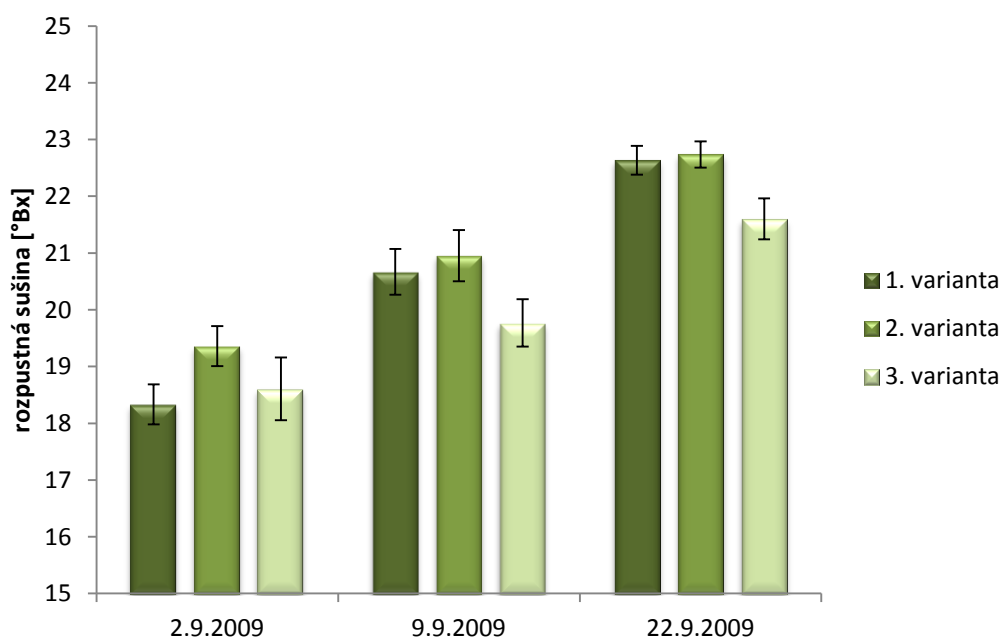
u druhé a třetí varianty. U keřů, kde byla zachována největší plocha listů, se hodnota rozpustné sušiny hroznů navýšila během posledních 17 dnů zrání o 3,9 °Bx z původních  $19,6 \pm 0,15$  °Bx na  $23,9 \pm 0,2$  °Bx. Statisticky nejvyšší hodnoty rozpustné sušiny měly hrozny u první ( $23,9 \pm 0,2$  °Bx) a druhé varianty ( $23,6 \pm 0,5$  °Bx) v termínu sklizně, ale také hrozny u první varianty ( $23,2 \pm 0,3$  °Bx) 5 dnů před sklizní (tabulka 1 Přílohy). Podobný vliv intenzity zakracování letorostů na obsah rozpustné sušiny u odrůdy Rulandské šedé zjistili GELLER a KURTURAL (2013). Na keřích, kde neprováděli žádné zakracování letorostů, sklidili hrozny, které měly nejvyšší rozpustnou sušinu. Nejnižší hodnotu rozpustné sušiny naopak vykazovaly hrozny, které byly na keřích s nejméně intenzivním zásahem. Ke stejným závěrům také dospěl MARTINEZ de TODA et al. (2013), který redukoval listovou plochu u dvou odrůd révy *Vitis vinifera* L. Hrozny odrůdy Tempranillo měly na ošetřené vinici o 3,5 °Bx méně než hrozny na keřích s větší listovou plochou, u odrůdy Grenache to bylo o 3,2 °Bx méně. Pokus byl opakován ve třech letech a vždy byl potvrzen stejný trend.



**Obrázek 6: Rozpustná sušina v hroznech odrůdy Rulandské šedé v roce 2008 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře**

V roce 2009 byly u odrůdy Rulandské šedé provedeny tři odběry v termínech 2. 9., 9. 9. a 22. 9., kdy byla provedena sklizeň hroznů. V tomto roce, v porovnání s předcházejícím, nedosahovaly hrozny tak vysokých hodnot rozpustné sušiny. Statisticky prokazatelně nejvyšší byly, stejně jako v roce 2008, u hroznů na keřích

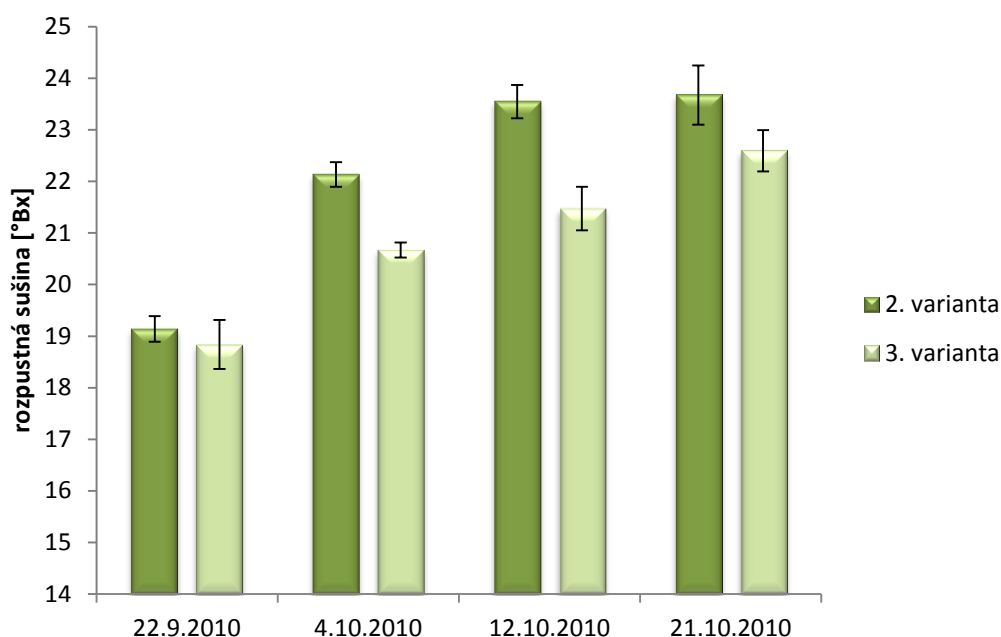
ošetřených první a druhou variantou (tabulka 2 Přílohy). V posledním termínu měly hrozny rozpustnou sušinu  $22,6 \pm 0,3$  °Bx u první varianty a prakticky totožnou hodnotu  $22,7 \pm 0,2$  °Bx u druhé varianty, u třetí varianty byla zjištěna hodnota nejnižší  $21,6 \pm 0,4$  °Bx. I když se radikální odstranění listové plochy na keřích projevilo v nižším obsahu rozpustné sušiny v hroznech, nebyl tento rozdíl tak výrazný jako v předcházejícím roce a statisticky významné rozdíly byly zjištěny pouze mezi druhou a třetí variantou. Ve srovnání s rokem 2008, byl především u hroznů ve třetí variantě, sledován poměrně výrazný nárůst (3 °Bx za 20 dnů zrání). Obsahy rozpustné sušiny hroznů u jednotlivých variant jsou znázorněné na obrázku 7.



**Obrázek 7: Rozpustná sušina v hroznech odrůdy Rulandské šedé v roce 2009 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře**

Rok 2010 byl doprovázen nadprůměrnými srážkovými úhrny a nižší teplotou v období zrání hroznů. Následkem opožděného kvetení a tedy i zakládání, růstu a dozrávání hroznů révy byly odběry vzorků provedeny, oproti minulým rokům, v pozdějších termínech: 22. 9., 4. 10., 12. 10. a 21. 10. V tomto roce byly keře odrůdy Rulandské šedé ošetřeny pouze ve druhé a třetí variantě.

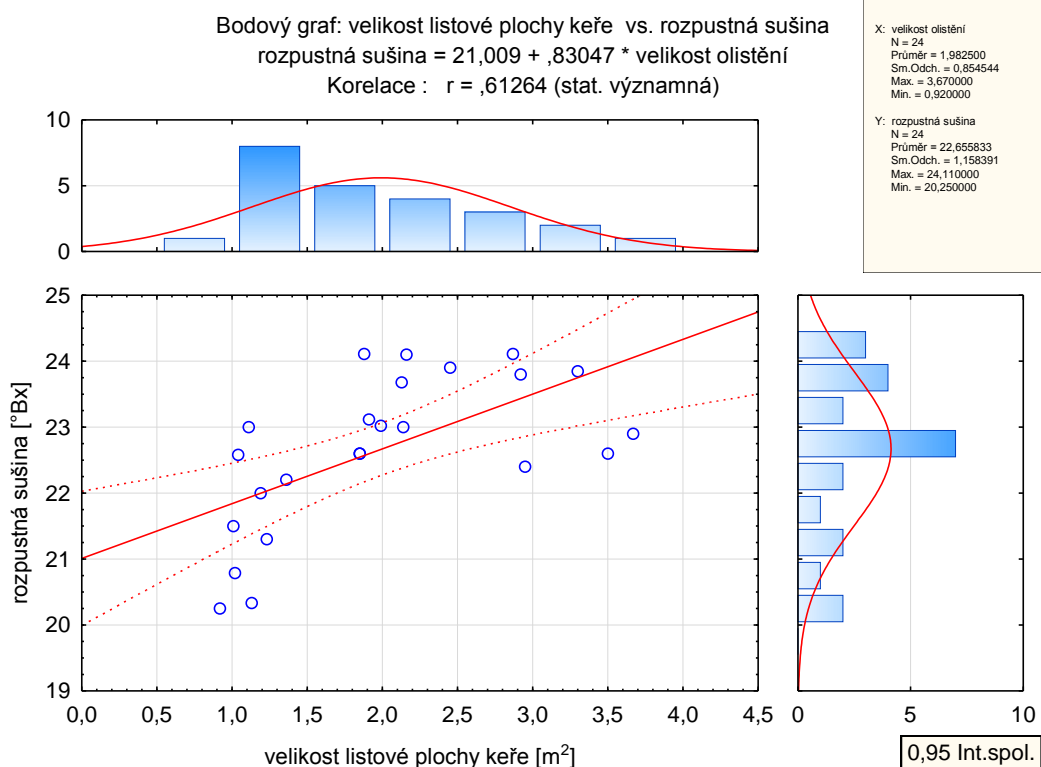




**Obrázek 8:** Rozpustná sušina v hroznech odrůdy Rulandské šedé v roce 2010 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře

Stejná závislost listové plochy na obsahu rozpustné sušiny, jako v předchozích letech, byla potvrzena i v posledním roce pozorování. Hrozny na keřích s větší listovou plochou vykazovaly vyšší hodnoty rozpustné sušiny, statisticky průkazné rozdíly však nebyly potvrzeny (tabulka 3 Přílohy). Nejvyšší hodnota ( $23,7 \pm 0,6$  °Bx) byla naměřena u hroznů, ve druhé variantě ošetření, v posledním termínu odběru. Ve stejném termínu měly hrozny ve třetí variantě hodnotu rozpustné sušiny o  $1,1^\circ$  nižší. Jak znázorňuje obrázek 8, v prvním termínu odběru ještě nebyl rozdíl v obsahu rozpustné sušiny mezi variantami tak výrazný, tvořil pouze  $0,3$  °Bx. Po 12 dnech zrání došlo k navýšení hodnoty rozpustné sušiny u druhé varianty o 3 stupně, po 20 dnech o  $4,4$  stupňů a v termínu sklizně dosáhla hodnota  $23,7 \pm 0,4$  °Bx. Celkem došlo u této varianty ke zvýšení rozpustné sušiny o  $4,6$  °Bx v posledních 29 dnech zrání. U třetí varianty bylo pozorováno navýšení pouze o  $3,8$  °Bx. Vliv odstranění listů ze spodní části letorostu u odrůdy Rulandské šedé sledovali také SABBATINI a HOWELL (2010). Připravili tři varianty ošetření, kdy odstranili 0, 4 a 6 listů vždy na basální části letorostu. Obsah rozpustné sušiny v hroznech však byl u všech tří variant obdobný a v tomto případě se tedy nepotvrdil průkazný vliv ošetření.

Při porovnání velikosti listové plochy a obsahu rozpustné sušiny v hroznech na konci pozorování ze všech experimentálních období byla potvrzena statisticky významná pozitivní korelace (obrázek 9).

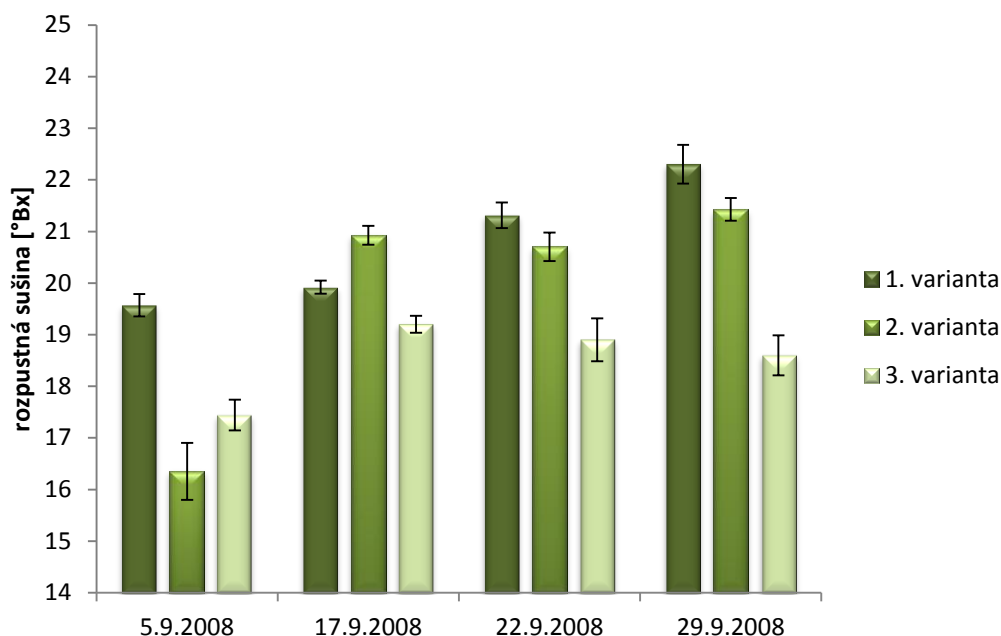


**Obrázek 9: Korelační analýza mezi velikostí listové plochy keře a obsahem rozpustné sušiny v hroznech odrůdy Rulandské šedé**

### **Pozorování u odrůdy Sauvignon**

Termíny odběrů odrůdy Sauvignon byly v roce 2008 celkem čtyři, 5. 9., 17. 9. a 22. 9. a 29. 9. Stejně jako u odrůdy Rulandské šedé, měla velikost listové plochy u odrůdy Sauvignon významný vliv na obsah cukrů v hroznech. V tomto případě již při prvním odběru měly keře s největší listovou plochou hrozny s prokazatelně nejvyšší cukernatostí ( $19,6 \pm 0,2$  °Bx). Z obrázku 10 je patrné, že u první a druhé varianty docházelo v průběhu pozorování ke stálému narůstání obsahu cukrů v bobulích. Nejvyšší rozdíl mezi prvním a posledním měřením byl pozorován u druhé varianty, kde měly hrozny na počátku experimentu průměrný obsah rozpustné sušiny  $16,35 \pm 0,6$  °Bx, a po 24 dnech zrání dosahovala průměrná hodnota  $21,43 \pm 0,2$  °Bx. Nejvíce znatelný nárůst byl mezi termíny 5. 9. a 17. 9., za 12 dnů se u této varianty zvýšila rozpustná sušina hroznů o  $4,6$  °Bx. Rozdíly mezi hodnotami v prvním a posledním termínu odběru nebyly u ostatních variant tak výrazné, u první varianty se zvýšila rozpustná sušina v hroznech o  $2,7$  °Bx, u třetí varianty o  $1,2$  °Bx. Statisticky významné rozdíly byly potvrzeny pouze u první varianty, druhá a třetí varianta nevykazovala statisticky průkazný rozdíl (tabulka 7 Přílohy). PETRIE et al. (2003) uvádí, že snížení velikosti

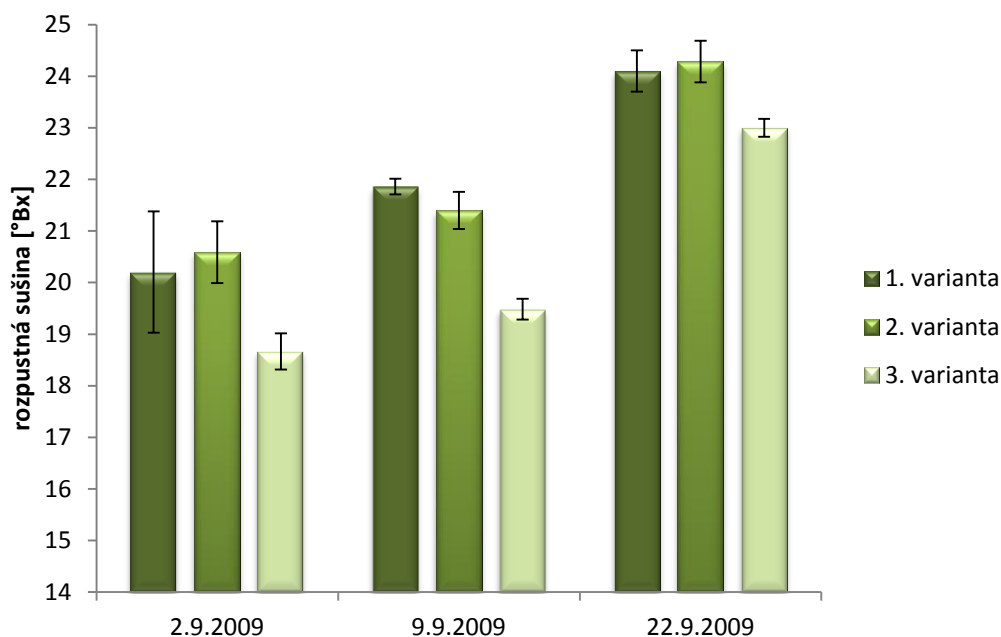
listové plochy u odrůdy Sauvignon Blanc vede ke snížení intenzity fotosyntézy, což má za následek nižší obsah rozpustné sušiny v hroznech, což potvrzují také výsledky této práce.



**Obrázek 10: Rozpustná sušina v hroznech odrůdy Sauvignon v roce 2008 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře**

V roce 2009 byly odběry vzorků provedeny v termínech 2. 9., 9. 9. a 22. 9. V tomto roce hrozny odrůdy Sauvignon dosahovaly poměrně vysokých hodnot rozpustné sušiny. U hroznů první a druhé varianty byla na konci zralosti překročena hranice 24 °Bx ( $24,3 \pm 0,4$  °Bx u druhé varianty,  $24,1 \pm 0,4$  °Bx u první varianty). I když nebyl potvrzen statisticky průkazný rozdíl mezi jednotlivými variantami v posledním termínu odběru, tak hrozny na keřích s nejmenší listovou plochou obsahovaly, obdobně jako v předchozím roce, nejmenší průměrnou hodnotu rozpustné sušiny (tabulka 8 Přílohy). V termínu sklizně to bylo  $23,0 \pm 0,2$  °Bx, tedy o více než 1 °Bx méně než u první a druhé varianty. Z pohledu obsahu této veličiny vykazovaly hrozny v první a druhé variantě ve všech termínech velmi podobné hodnoty, u kterých nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl. U třetí varianty byl obsah rozpustné sušiny vždy nižší, jak je znázorněno na obrázku 11. Hrozny na keřích s nejmenší listovou plochou, tedy třetí varianta ošetření, měly na konci zralosti hodnotu  $23,0 \pm 0,2$  °Bx. Tyto výsledky se shodují s tvrzením NOAR et al. (2002), že navýšení listové plochy na

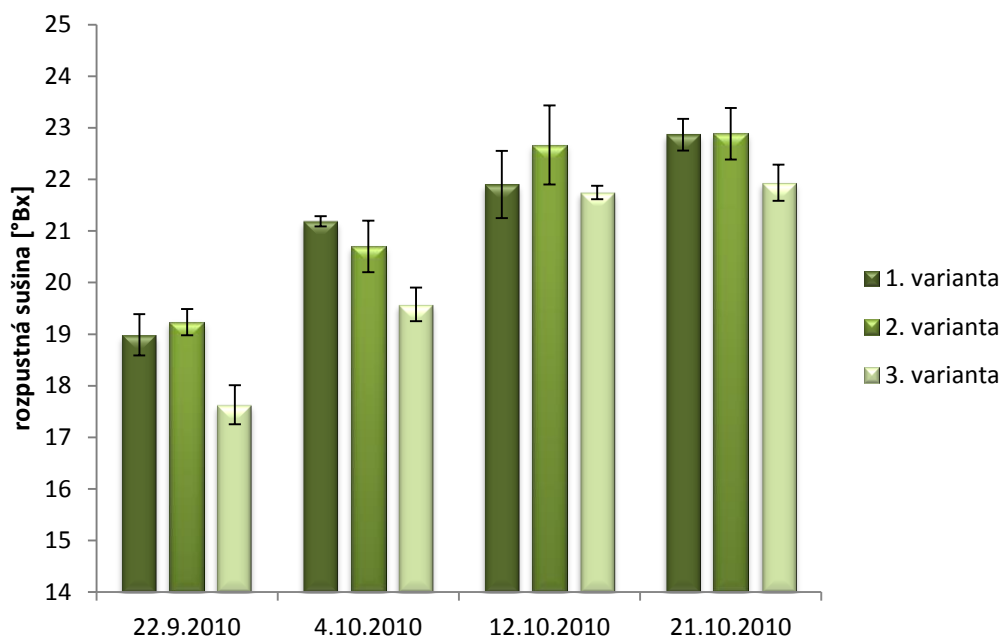
gram hroznu u odrůdy Sauvignon Blanc vede ke zvyšování obsahu rozpustné sušiny v bobulích.



**Obrázek 11: Rozpustná sušina v hroznech odrůdy Sauvignon v roce 2009 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře**

V roce 2010 byly vzorky odebírány ve stejných termínech jako u odrůdy Rulandské šedé. Klimatické podmínky v tomto roce, charakteristické především nižšími teplotami a vyšším srážkovým úhrnem, ovlivnily také hodnoty rozpustné sušiny hroznů u odrůdy Sauvignon. Jak lze vidět na obrázku 12, tak hrozny v tomto roce nedosahovaly takových hodnot rozpustné sušiny jako v předchozím roce. I ve třetím ročníku experimentu bylo zjištěno, že hrozny na keřích s nejmenší listovou plochou vykazují nejnížší hodnoty rozpustné sušiny. I přesto však byl u této varianty pozorován výraznější nárůst než u první a druhé varianty. Počáteční hodnota 17,2 se po 29 dnech zrání zvýšila o 4,3 °Bx. U první varianty došlo ke zvýšení hodnoty o 3,9 °Bx a u druhé k nejnižšímu nárůstu o 3,7 °Bx. V termínu sklizně vykazovaly hrozny u první i druhé varianty totožnou hodnotu 22,9 °Bx, u třetí varianty byla naměřena hodnota 21,9 ± 0,4 °Bx. Po přepočtu °Bx na °NM se hrozny u první a druhé varianty pohybovaly v kategorii pozdní sběr. Na konci zrání nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl mezi variantami (tabulka 9 Přílohy). Důležitým faktorem pro odlišování je samotný termín provedení, TARDAQUILA et al. (2010) uvádí, že odstranění listů v pozdějších fázích

zrání hroznů již neovlivní obsah rozpustné sušiny, ani s ní související obsah alkoholu ve víně.



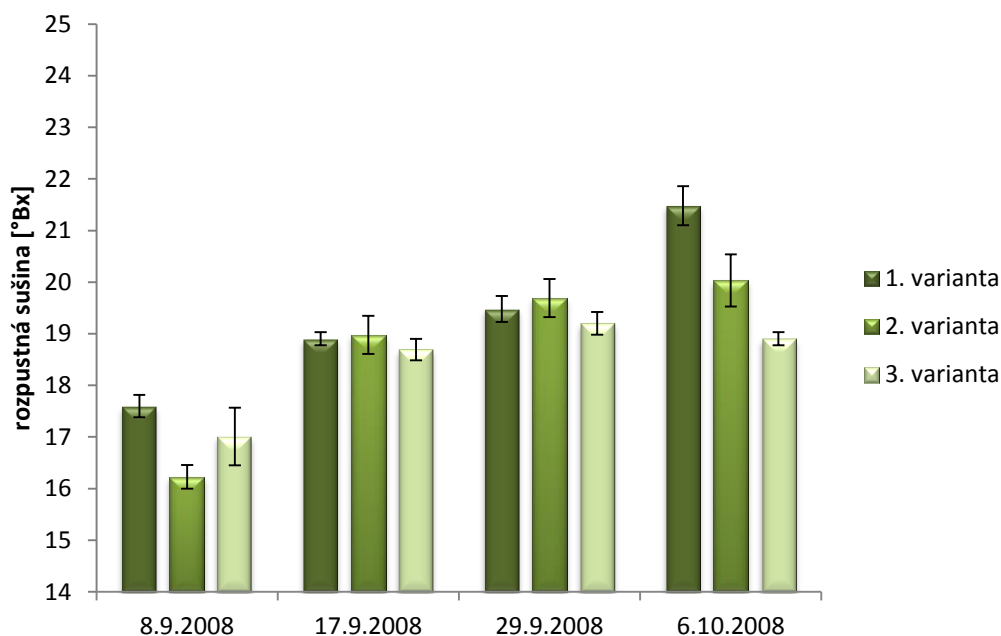
**Obrázek 12:** *Rozpustná sušina v hroznech odrůdy Sauvignon v roce 2010 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře*

U odrůdy Sauvignon se také potvrdila statisticky významná korelace mezi velikostí listové plochy keře a obsahem rozpustné sušiny v hroznech (obrázek 17 Přílohy).

#### **4.2.1.1 Pozorování u odrůdy Ryzlink rýnský**

V roce 2008 byly vzorky odebírány v následujících termínech: 8. 9., 17. 9., 29. 9. a 6. 10. Trend závislosti rozpustné sušiny hroznů odrůdy Ryzlink rýnský (obrázek 13) na variantách ošetření byl obdobný jako u odrůdy Sauvignon. V prvním termínu byl zjištěn průkazný rozdíl pouze mezi první a druhou variantou, kdy hrozny ve druhé variantě vykazovaly nejnižší hodnoty rozpustné sušiny ( $16,2 \pm 0,2$  °Bx). V dalších dvou termínech 17. a 29. 9. se rozpustná sušina hroznů pohybovala u všech tří variant na velmi podobných hodnotách, kdy nebyly zjištěny statisticky průkazné rozdíly. Významně průkazné rozdíly mezi jednotlivými variantami se projevily až v posledním odběru (tabulka 13 Přílohy), kde opět nejvyšších hodnot rozpustné sušiny dosáhly hrozny u první varianty ( $21,5 \pm 0,2$  °Bx) a nejnižší hodnoty u třetí varianty ( $18,9 \pm 0,1$  °Bx). Hrozny u všech variant splňovaly kritéria pouze pro kategorii

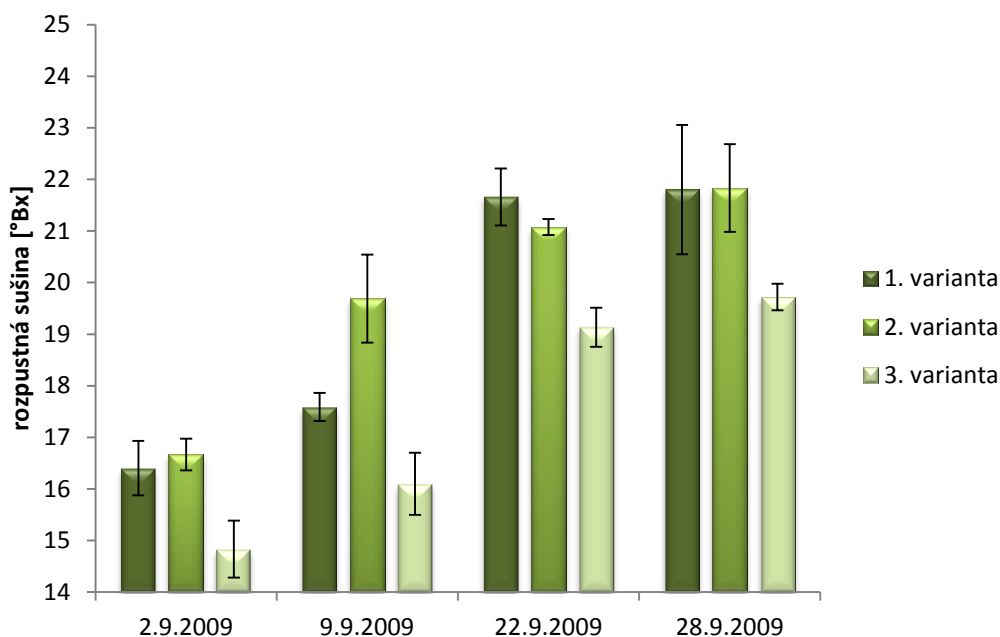
kabinetní víno. ZOECKLEIN et al. (1992) sledovali vliv intenzity ošetření letorostů na odrůdě Ryzlink rýnský během tříletého pokusu. S výjimkou prvního roku pozorování se potvrdil podobný trend, tedy že u keřů s nižší intenzitou zásahů na regulaci listové plochy vykazovaly hrozny vyšší obsahy rozpustné sušiny.



**Obrázek 13:** *Rozpustná sušina v hroznech odrůdy Ryzlink rýnský v roce 2008 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře*

V roce 2009 byly odebrány vzorky ve čtyřech termínech, 2. 9., 9. 9., 22. 9. a 28. 9. S výjimkou druhého termínu odběru (9. 9.) byly hodnoty rozpustné sušiny u hroznů první a druhé varianty prakticky totožné, v posledním termínu byla naměřena hodnota u obou variant 21,8 °Bx. U třetí varianty měly hrozny v termínu sklizně pouze  $19,7 \pm 0,3$  °Bx, tedy o více než 2 °Bx méně než u varianty první a druhé, rozdíl byl statisticky průkazný (tabulka 14 Přílohy). Z obrázku 14 je patrné, že víceméně stejný rozdíl mezi třetí a zbývajícími dvěma variantami byl pozorován ve všech termínech odběrů. Výjimkou byl druhý termín odběru, kde byl pozorován výrazný nárůst u druhé varianty ošetření. Na hodnotu rozpustné sušiny v hroznech může mít vliv také šetrnost řezu při zakracování letorostů, PERCIVAL et al. (1994) porovnával rozdíl při použití mechanizovaných prostředků na redukci listové plochy oproti ručnímu provedení. Uvádí, že u ručně provedené regulace došlo k mírnému zvýšení rozpustné sušiny v hroznech ve srovnání s mechanizovaným odstraněním. GUIDONI et al. (1994)

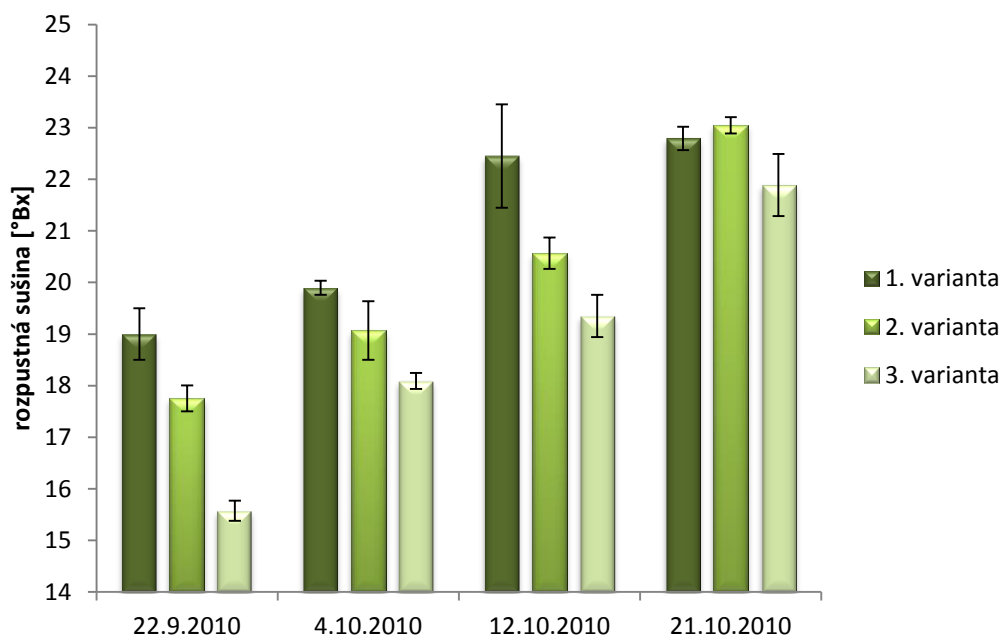
naopak uvádí, že mezi mechanizovaným a ručním odstraněním listů nebyl zjištěn žádný rozdíl ve složení hroznů.



**Obrázek 14:** Rozpustná sušina v hroznech odrůdy Ryzlink rýnský v roce 2009 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře

V roce 2010 byly vzorky odebrány ve stejných termínech jako u odrůd Sauvignon a Rulandské šedé. Již v prvním termínu odběru se projevila významná rozdílnost mezi sledovanými variantami, především u keřů s nejmenší listovou plochou měly hrozny výrazně nižší hodnoty rozpustné sušiny ( $15,6 \pm 0,2$  °Bx), naopak nejvyšší hodnoty vykazovaly hrozny na keřích s největší listovou plochou ( $19,0 \pm 0,5$  °Bx). Tento výrazný rozdíl se však na konci zralosti poněkud vyrovnal a v termínu sklizně již hrozny ve třetí variantě měly hodnotu rozpustné sušiny nižší pouze o  $0,9$  °Bx než hrozny ve variantě první. Nejvyšší hodnoty však byly naměřeny u hroznů druhé varianty ( $23,0 \pm 0,2$  °Bx). I přesto, že hrozny v první variantě obsahovaly v prvním termínu odběru nejvyšší hodnotu rozpustné sušiny, tak v průběhu zrání nedocházelo k tak prudkému nárůstu jako u varianty druhé a třetí. Proto byly hodnoty v období sklizně u všech variant vyrovnanější (obrázek 15) a nebyl mezi nimi zjištěn statistický významný rozdíl (tabulka 15 Přílohy). STOLL et al. (2013) sledovali vliv velikosti listové plochy na keři na obsah rozpustné sušiny v hroznech. Hrozny na keřích s listovou plochou  $1,59 \pm 0,2$  m<sup>2</sup> měly hodnotu rozpustné sušiny  $18,1 \pm 1,6$  °Bx, u listové plochy  $2,93 \pm 0,5$  m<sup>2</sup> obsahovaly  $23,2 \pm 1,9$  °Bx, u celkové plochy listů

$2,8 \pm 0,5 \text{ m}^2$  byla naměřena stejná hodnota  $23,2 \pm 1,8 \text{ }^\circ\text{Bx}$  a u největší listové plochy  $3,45 \pm 0,4 \text{ m}^2$  nejvyšší hodnota rozpustné sušiny  $25,2 \pm 1,5 \text{ }^\circ\text{Bx}$ . Byla tedy potvrzena stejná závislost jako v této práci. Snížení obsahu rozpustné sušiny v hroznech na keřích s redukovanou listovou plochou bylo potvrzeno v řadě vědeckých publikací (KLEWER, DOKOOZLIAN, 2005; INTRIERI, FILIPPETTI, 2009; STOLL et al., 2009).



**Obrázek 15:** *Rozpustná sušina v hroznech odrůdy Ryzlink rýnský v roce 2010 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře*

Statisticky významná korelace mezi velikostí listové plochy a obsahem rozpustné sušiny v hroznech odrůdy Ryzlink rýnský nebyla potvrzena (obrázek 19 Přílohy).

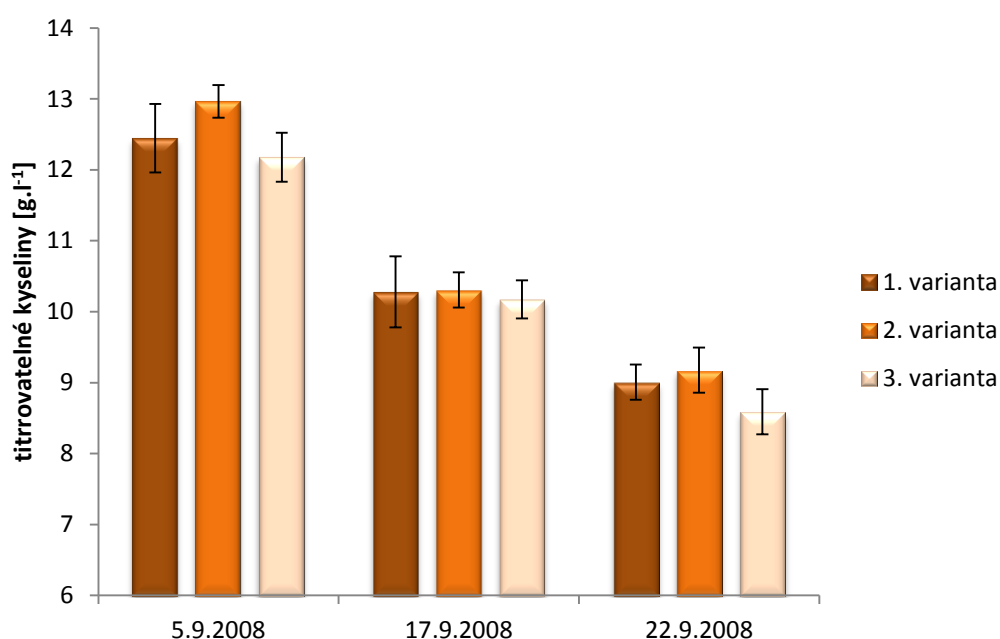
#### **4.2.2 Vliv velikosti listové plochy keře na obsah titrovatelných kyselin v hroznech**

##### **4.2.2.1 Pozorování u odrůdy Rulandské šedé**

V hroznech odrůdy Rulandské šedé docházelo k akumulaci titrovatelných kyselin nejednoznačně s přihlédnutím na velikost listové plochy keře. Někteří autoři uvádějí, že vyšší množství letorostů na jednotku plochy a větší listová plocha má za následek nižší obsah kyselin v hroznech při sklizni (GELLER, KURTURAL, 2013). Jiní autoři tvrdí, že vliv redukce listové plochy na obsah titrovatelných kyselin v hroznech nebyl potvrzen (ZAMBONI et al., 1996). V roce 2008 byl u odrůdy



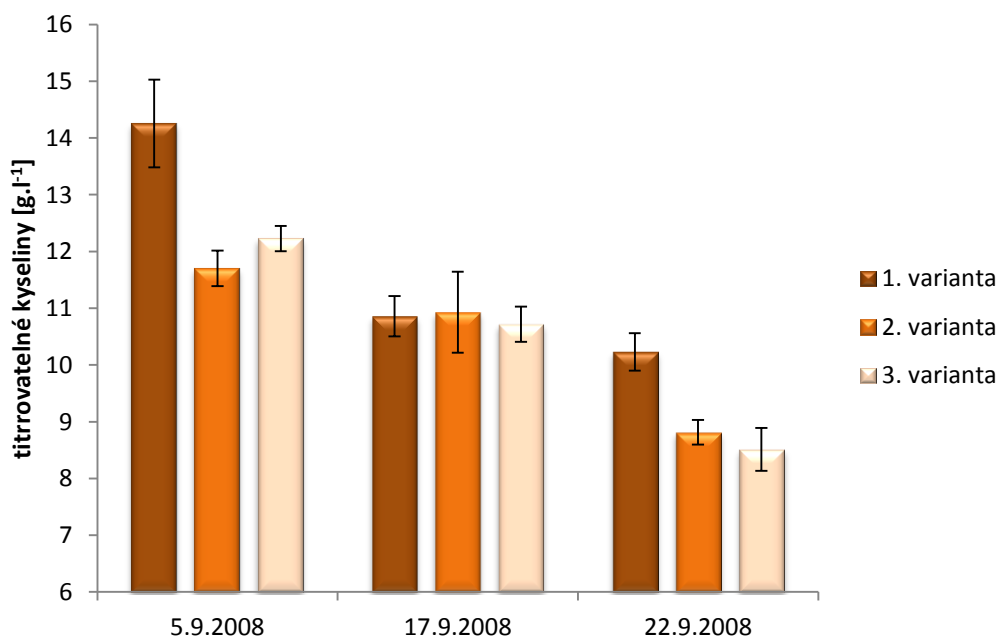
Rulandské šedé projev intenzity zakrácení letorostů na obsahu titrovatelných kyselin v hroznech stejně nejednoznačný jako ve výše uvedených publikacích. Byly zjištěny statisticky prokazatelné poklesy obsahů v průběhu dozrávání hroznů, avšak v rámci jednotlivých variant nebyly zjištěny významné rozdíly (obrázek 16, tabulka 4 Přílohy). Nejvyšší množství kyselin obsahovaly hrozny u druhé varianty (1. termín –  $12,9 \pm 0,2 \text{ g.l}^{-1}$ , 2. termín –  $10,3 \pm 0,3 \text{ g.l}^{-1}$ , 3. termín –  $9,2 \pm 0,3 \text{ g.l}^{-1}$ ), naopak nejnižší u varianty třetí (1. termín –  $12,2 \pm 0,4 \text{ g.l}^{-1}$ , 2. termín –  $10,2 \pm 0,3 \text{ g.l}^{-1}$ , 3. termín –  $8,6 \pm 0,3 \text{ g.l}^{-1}$ ).



**Obrázek 16: Titrovatelné kyseliny v hroznech odrůdy Rulandské šedé v roce 2008 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře**

Projev závislosti velikosti listové plochy na obsahu kyselin v hroznech, který nebyl pozorován v roce 2008, se v roce 2009 potvrdil. Především u hroznů u první varianty ošetření, které vykazovaly vyšší hodnoty titrovatelných kyselin než hrozny u zbývajících dvou variant (obrázek 17). V prvním termínu odběru byl zjištěn nejvyšší obsah titrovatelných kyselin v hroznech ( $14,3 \pm 0,8 \text{ g.l}^{-1}$ ) na keřích s největší listovou plochou ( $3,38 \pm 0,38 \text{ m}^2$ ), hrozny druhé a třetí varianty obsahovaly ve stejném termínu o více než  $2 \text{ g.l}^{-1}$  méně. Při druhém odběru byl obsah titrovatelných kyselin v hroznech velmi podobný u všech variant, pohyboval se v rozmezí od  $10,7 \pm 0,3$  do  $10,9 \pm 0,7 \text{ g.l}^{-1}$ . V termínu sklizně byl sledován obdobný trend v obsahu titrovatelných kyselin jako v prvním termínu odběru, nejvyšší obsah ( $10,2 \pm 0,3 \text{ g.l}^{-1}$ ) vykazovaly

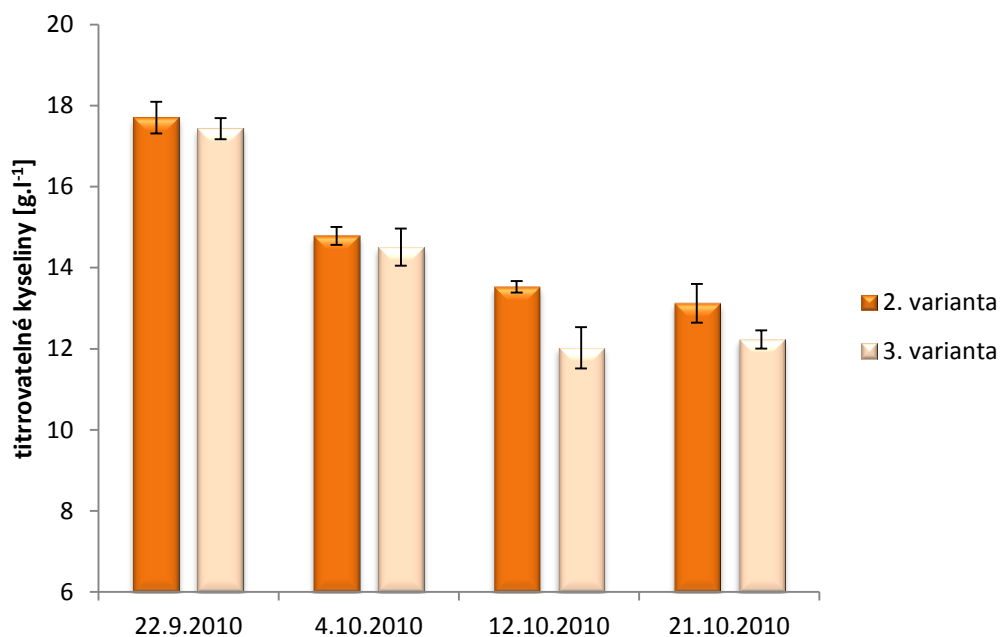
hrozny u první varianty, hrozny u druhé varianty obsahovaly  $8,8 \pm 0,2 \text{ g.l}^{-1}$  a u třetí varianty  $8,5 \pm 0,4 \text{ g.l}^{-1}$ . Statisticky průkazný rozdíl byl potvrzen pouze u první varianty, rozdíly mezi druhou a třetí variantou byly statisticky neprůkazné (tabulka 5 Přílohy). Na základě těchto výsledků by se dalo konstatovat, že v průběhu zrání hroznů, způsobuje větší listová plocha vyšší akumulaci kyselin v hroznech. Což se neshoduje s výsledky podobných prací (MORRIS, 2007; GELLER, KURTURAL, 2013). Aktuální výsledky výzkumů se staví na stranu tvrzení, že organické kyseliny v hroznech se tvoří v procesu fotosyntézy přímo v bobulích a nejsou transportovány z listů (PAVLOUŠEK, 2011). Nicméně na základě naměřených hodnot, v tomto roce, by se dalo předpokládat, že z listů mohou být transportovány látky, které mají přímý vliv na tvorbu kyselin v bobulích.



**Obrázek 17: Titrovatelné kyseliny v hroznech odrůdy Rulandské šedé v roce 2009 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře**

Klimatické podmínky v roce 2010 měly za následek velmi vysoké obsahy titrovatelných kyselin v hroznech. V prvním termínu odběru bylo u obou variant naměřeno v hroznech téměř  $18 \text{ g.l}^{-1}$  titrovatelných kyselin (druhá varianta –  $17,7 \pm 0,3 \text{ g.l}^{-1}$ , třetí varianta  $17,4 \pm 0,1 \text{ g.l}^{-1}$ ). Po 12 dnech zrání došlo ke snížení o  $2,9 \text{ g.l}^{-1}$  u obou variant, po 20 dnech se obsah snížil o  $5,3 \pm 0,5 \text{ g.l}^{-1}$  u třetí varianty a o  $4,1 \pm 0,1 \text{ g.l}^{-1}$  u druhé varianty. V posledním sklizňovém termínu obsahovaly hrozny ve druhé variantě  $13,1 \pm 0,5 \text{ g.l}^{-1}$  a ve třetí variantě  $12,2 \pm 0,2 \text{ g.l}^{-1}$ , což jsou poměrně

vysoké hodnoty. I když obsahovaly hrozny na keřích s větší listovou plochou vyšší hodnoty titrovatelných kyselin (obrázek 18), nebyla tato hodnota natolik rozdílná od třetí varianty, aby byla statisticky prokazatelná (tabulka 6 Přílohy). V roce 2010 sledovali GELLER a KURTURAL (2013) vliv intenzity zakracování letorostů na obsah titrovatelných kyselin u odrůdy Rulandské šedé. Zjistili, že na keřích bez provedení osečkování měly hrozny nejnižší obsah titrovatelných kyselin.

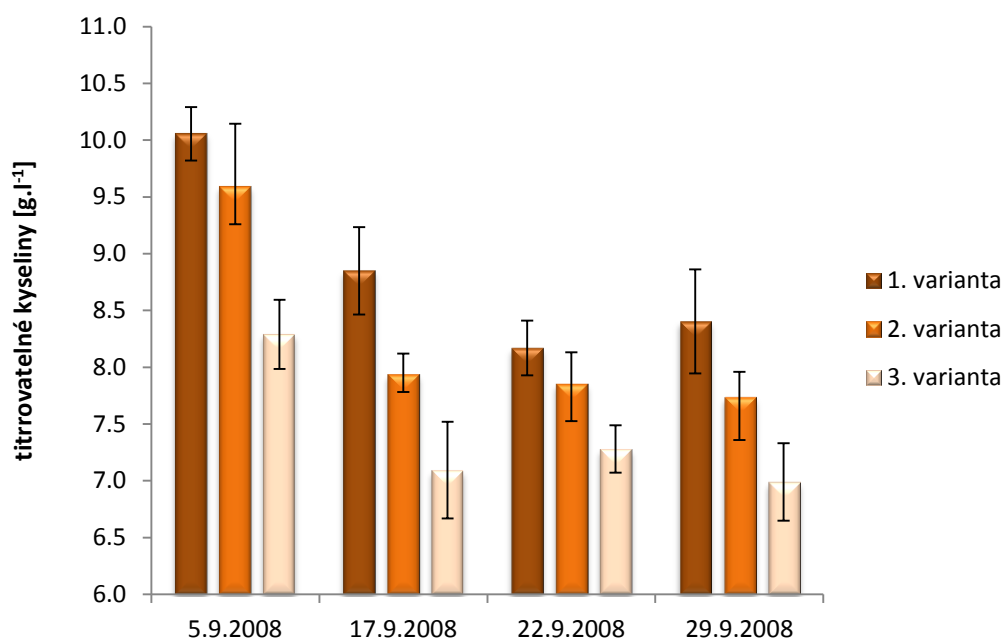


**Obrázek 18:** *Titrovatelné kyseliny v hroznech odrůdy Rulandské šedé v roce 2010 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře*

Mezi velikostí listové plochy keře a hodnot titrovatelných kyselin v hroznech nebyla potvrzena statisticky významná korelace (obrázek 16 Přílohy).

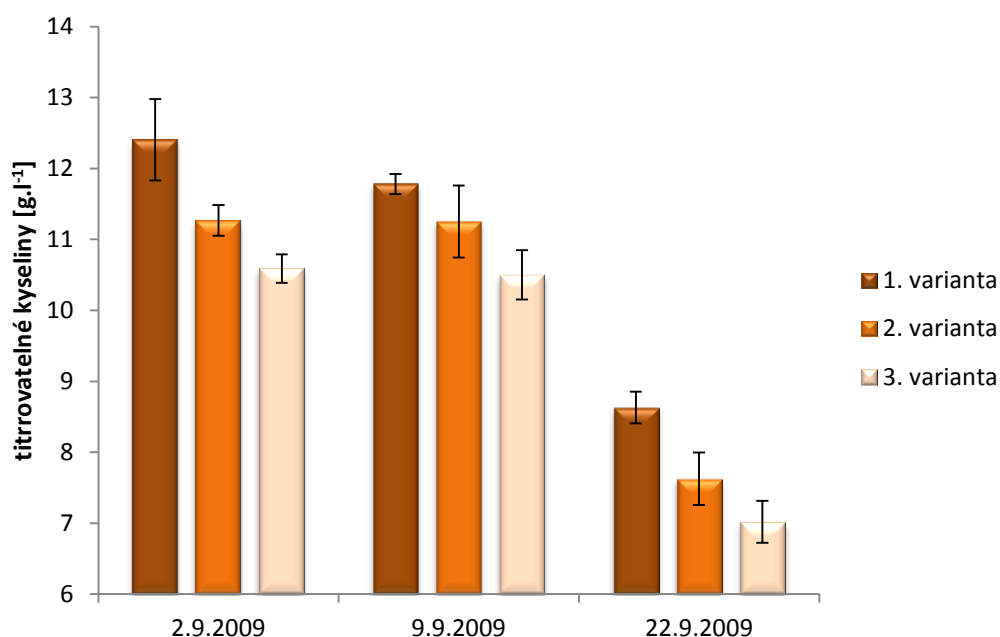
#### **4.2.2.2 Pozorování u odrůdy Sauvignon**

Na rozdíl od odrůdy Rulandské šedé se u odrůdy Sauvignon projevila pozitivní závislost velikost listové plochy na množství titrovatelných kyselin (obrázek 19). Nejvyšší obsahy kyselin měly vždy hrozny na keřích bez zkrácených letorostů, tedy s největší listovou plochou, i když statisticky významně odlišná byla na konci zralosti pouze první varianta (tabulka 10 Přílohy). Keře s nejmenší plochou listové stěny měly v hroznech naopak nejmenší množství kyselin. K nejvýraznějšímu poklesu došlo v průběhu pozorování u druhé varianty. Po dobu 24 dnů zrání se v hroznech snížil obsah titrovatelných kyselin o  $1,9 \text{ g.l}^{-1}$  z původní hodnoty  $9,6 \pm 0,3 \text{ g.l}^{-1}$  na  $7,7 \pm 0,4 \text{ g.l}^{-1}$ .



**Obrázek 19:** *Titrovatelné kyseliny v hroznech odrůdy Sauvignon v roce 2008 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře*

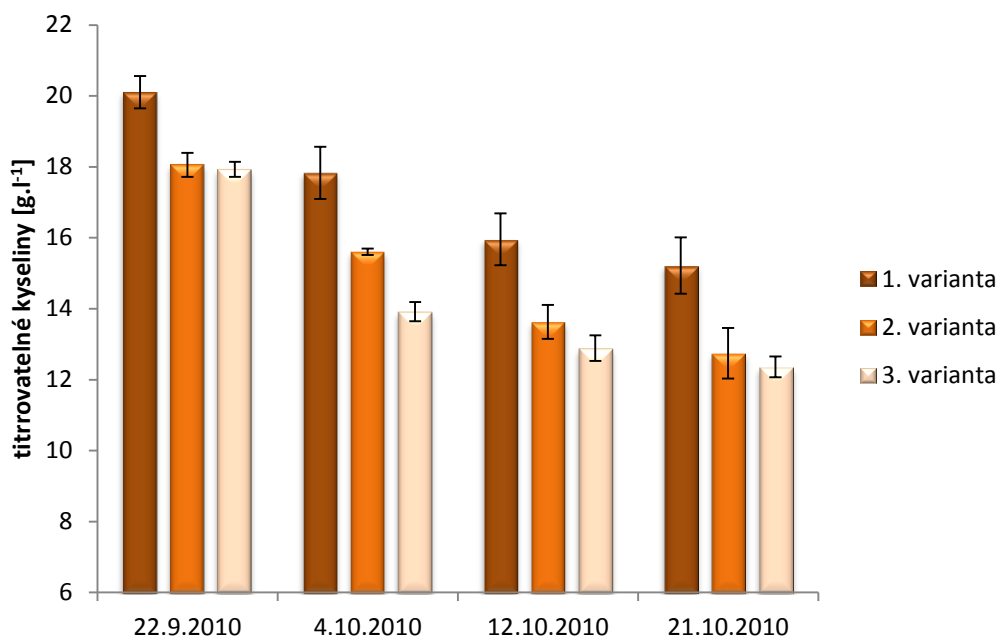
Závislost listové plochy na obsahu titrovatelných kyselin v hroznech, která byla pozorována v přechodném roce se potvrdila i v roce 2009. Nejméně titrovatelných kyselin obsahovaly opět hrozny na keřích s nejmenší listovou plochou. U této varianty došlo po 20 dnech zrání ke snížení hodnoty z  $10,1 \pm 0,2 \text{ g.l}^{-1}$  na hodnotu  $7,0 \pm 0,3 \text{ g.l}^{-1}$ . Nejvýraznější snížení bylo pozorováno u první varianty, kde se v hroznech během posledních 20 dnů dozrávání snížil obsah kyselin o  $3,8 \text{ g.l}^{-1}$ . V posledním termínu odběru obsahovaly hrozny v jednotlivých variantách velmi podobné hodnoty titrovatelných kyselin jako v předchozím roce (obrázek 20). Statisticky průkazný rozdíl byl potvrzen mezi první a třetí variantou v posledním termínu odběru (tabulka 11 Přílohy). Hodnota titrovatelných kyselin nemusí vždy úzce souviset se sumou organických kyselin. BALÍK (2005) uvádí, že v moštu nalézáme pouze 75 % vodíkových protonů ze skutečného obsahu.



**Obrázek 20: Titrovatelné kyseliny v hroznech odrůdy Sauvignon v roce 2009 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře**

Na obsah titrovatelných kyselin v hroznech byl ročník 2010 velmi bohatý (obrázek 21). V prvním termínu obsahovaly hrozny téměř dvojnásobné množství kyselin než v roce 2008. Nejvyšší statisticky průkazný obsah byl pozorován opět u první varianty ve všech termínech odběru (tabulka 12 Přílohy). U prvního odběru hrozny v této variantě obsahovaly  $20,1 \pm 0,5 \text{ g.l}^{-1}$  titrovatelných kyselin, u druhé varianty  $18,1 \pm 0,3 \text{ g.l}^{-1}$  a u třetí varianty  $17,9 \pm 0,2 \text{ g.l}^{-1}$ . V průběhu 29 dní zrání docházelo k postupnému snižování. Nejvýraznější úbytek byl sledován na keřích s nejmenší listovou plochou. U této varianty měly hrozny v termínu sklizně o  $5,6 \text{ g.l}^{-1}$  méně, tedy  $12,4 \pm 0,3 \text{ g.l}^{-1}$ . Obsah kyselin v hroznech ve druhé variantě se snížil o  $5,3 \text{ g.l}^{-1}$  na výslednou hodnotu  $12,8 \pm 0,7 \text{ g.l}^{-1}$  a u první varianty bylo pozorováno snížení o  $4,9 \text{ g.l}^{-1}$  na hodnotu  $15,2 \pm 0,8 \text{ g.l}^{-1}$ . Podrobný průběh změn titrovatelných kyselin znázorňuje obrázek 13. Snížení titrovatelných kyselin v hroznech na keřích s redukovanou listovou plochou, které bylo pozorováno v roce 2009 a 2010 ověřuje tvrzení KLIEWERA et al. (1988). V jeho případě šlo o odstranění bazálních listů na letorostu, které způsobilo snížení titrovatelných kyselin v hroznech. K podobným závěrům dospěli také CANDOLFI-VASCONCELOS a KOBLET (1990) a KOZINA et al. (2008). Důvodem proč hrozny této odrůdy vykazují největší množství kyselin na keřích bez redukce listové plochy, může být bujnost růstu. Zatímco odrůda Rulandské šedé se řadí spíše mezi středně bujně rostoucí, odrůda Sauvignon je charakteristická

intenzivním růstem. Nezkrácené letorosty mohly svým převislým růstem způsobovat částečné zastínění hroznů a tedy i zpomalení odbourávání kyseliny jablečné, které je rychlejší při vyšších teplotách bobulí.



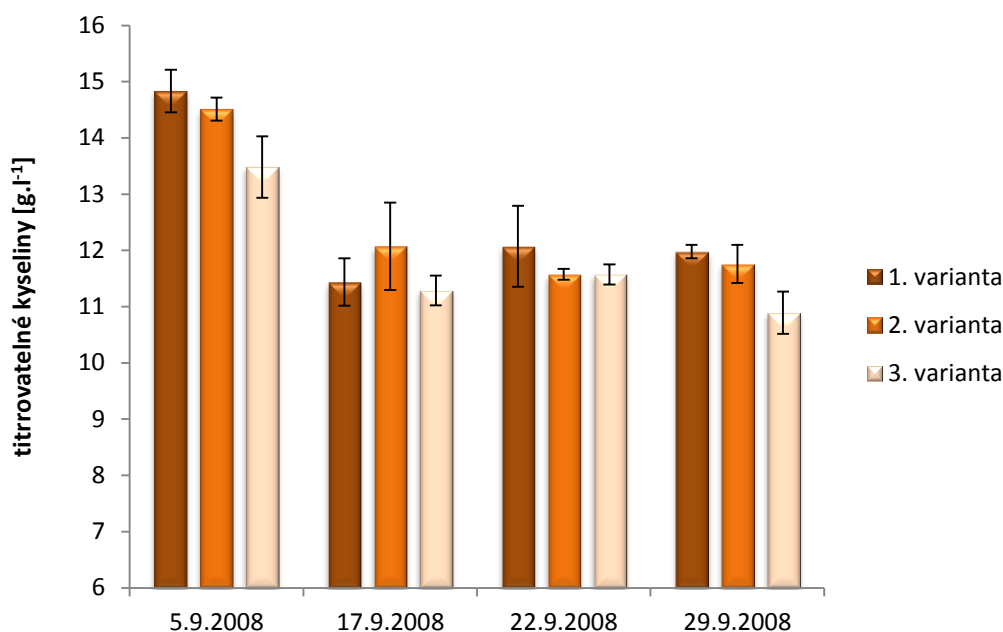
**Obrázek 21:** *Titrovatelné kyseliny v hroznech odrůdy Sauvignon v roce 2010 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře*

Na rozdíl od odrůdy Rulandské šedé se u odrůdy Sauvignon potvrdila statisticky významná korelace mezi velikostí listové plochy keře a obsahem titrovatelných kyselin v hroznech (obrázek 18 Přílohy).

#### **4.2.2.3 Pozorování u odrůdy Ryzlink rýnský**

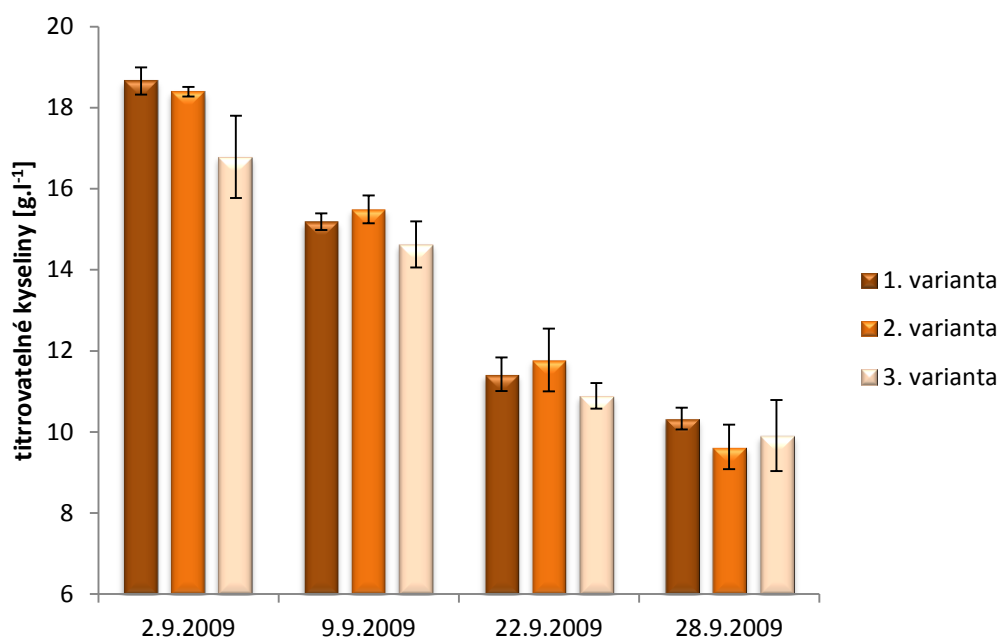
Pro odrůdu Ryzlink rýnský je typický vyšší obsah titrovatelných kyselin v hroznech (PAVLOUŠEK, 2005), což koresponduje s výsledky této práce, kde ze všech sledovaných odrůd měla právě tato nejvyšší hodnoty. V roce 2008 se s výjimkou druhého termínu odběru prokázala nejvyšší hodnota vždy u hroznů v první variantě ošetření. Počáteční obsah  $14,8 \pm 0,4 \text{ g.l}^{-1}$  se po 24 dnech zrání snížil na konečnou hodnotu  $11,9 \pm 0,1 \text{ g.l}^{-1}$ . Naopak nejnižší hodnoty byly naměřeny u třetí varianty a to ve všech termínech odběru. Hrozny v této variantě obsahovaly o více než  $1 \text{ g.l}^{-1}$  kyselin méně v prvním termínu odběru ( $13,5 \pm 0,6 \text{ g.l}^{-1}$ ) než hrozny v první variantě. Na konci zralosti byla hodnota titrovatelných kyselin u této varianty  $10,9 \pm 0,4 \text{ g.l}^{-1}$ . mezi jednotlivými variantami nebyl v posledním termínu potvrzen statisticky významný

rozdíl (tabulka 16 Přílohy). Nižší produkci titrovatelných kyselin v hroznech odrůdy Ryzlink, způsobenou redukovanou listovou plochou publikuje ve své práci také ZOECKLEIN et al. (1992). Ve svém tříletém pokusu se mu ve dvou letech potvrdilo, že na keřích s intenzivnějším ošetřením měly hrozny nižší hodnoty titrovatelných kyselin. Obsah kyselin je znázorněn na obrázku 22.



**Obrázek 22:** *Titrovatelné kyseliny v hroznech odrůdy Ryzlink rýnský v roce 2008 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře*

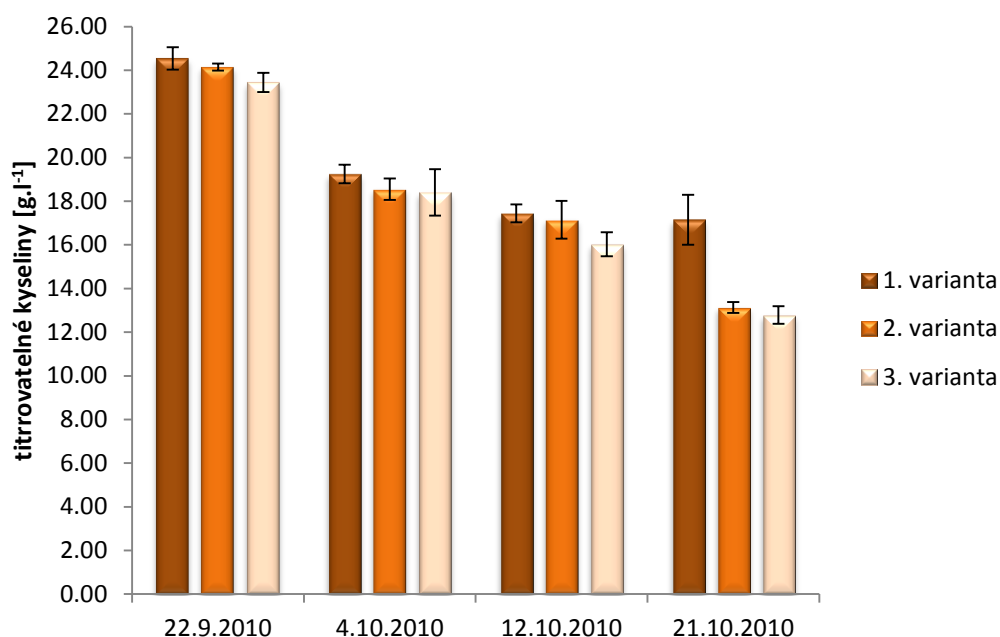
V roce 2009 byl obsah titrovatelných kyselin v prvním termínu odběru poměrně vysoký, nejvíce bylo zjištěno u hroznů první varianty ( $18,7 \pm 0,3 \text{ g.l}^{-1}$ ). V průběhu zrání docházelo k pozvolnému snižování obsahu titrovatelných kyselin v hroznech všech variant. Hodnoty titrovatelných kyselin na konci zralosti byly následující: první varianta –  $10,3 \pm 0,3 \text{ g.l}^{-1}$ , druhá varianta –  $9,6 \pm 0,6 \text{ g.l}^{-1}$ , třetí varianta –  $9,9 \pm 0,9 \text{ g.l}^{-1}$ . Nejvyšší hodnotu tedy vykazovaly hrozny první varianty, stejně jako na počátku sledovacího období. Podrobné hodnoty znázorňuje obrázek 23. Stejně jako v přecházejícím roce hodnoty titrovatelných kyselin u jednotlivých variant nebyly statisticky odlišné (tabulka 17 Přílohy).



**Obrázek 23: Titrovatelné kyseliny v hroznech odrůdy Ryzlink rýnský v roce 2009 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře**

Rok 2010 byl u všech sledovaných odrůd typický vysokým obsahem titrovatelných kyselin v hroznech. Ryzlink rýnský nebyl výjimkou, a proto i tato odrůda vykazovala nejvyšší hodnoty právě v tomto roce (obrázek 24). Především v prvním termínu (22. 9.) byly naměřeny extrémně vysoké hodnoty u všech variant ošetření. Nejvyšší hodnotu obsahovaly hrozny v první variantě ( $24,5 \pm 0,5 \text{ g.l}^{-1}$ ), naopak nejméně bylo zjištěno u třetí varianty ( $23,4 \pm 0,5 \text{ g.l}^{-1}$ ). I přes vysoké hodnoty v prvním termínu docházelo v průběhu zrání k poměrně výraznému snižování obsahu titrovatelných kyselin v hroznech. Již po 12 dnech od prvního termínu došlo ke snížení o více než  $5 \pm 1,1 \text{ g.l}^{-1}$  u druhé a třetí varianty, u první varianty poklesl obsah titrovatelných kyselin v hroznech o  $4,9 \pm 0,4 \text{ g.l}^{-1}$ . Ve třetím termínu byl opět sledován klesající trend obsahu kyselin, ovšem ne tak výrazný jako mezi třetím a posledním odběrem. Kde především u variant s menší listovou plochou bylo pozorováno velmi výrazné snížení. Hrozny u druhé varianty obsahovaly v posledním termínu o  $4,4 \pm 0,4 \text{ g.l}^{-1}$  méně než v předchozím termínu (před 9 dny) a hrozny třetí varianty o  $3,8 \pm 0,6 \text{ g.l}^{-1}$  méně. Obsah titrovatelných kyselin v hroznech u první varianty klesl za posledních 9 dnů zrání pouze od  $0,3 \pm 1,2 \text{ g.l}^{-1}$ , což mělo za následek extrémně vysoký obsah kyselin v období sklizně ( $17,2 \pm 1,2 \text{ g.l}^{-1}$ ), tento rozdíl byl statisticky významný (tabulka 18, Přílohy).





**Obrázek 24:** *Titrovatelné kyseliny v hroznech odrůdy Ryzlink rýnský v roce 2010 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy*

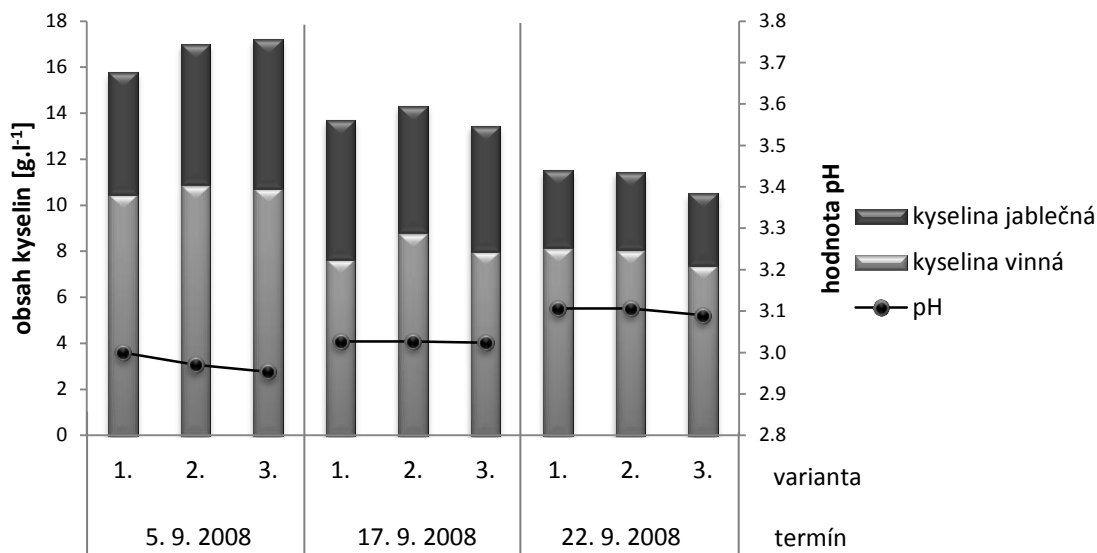
Statisticky významná korelace mezi obsahem titrovatelných kyselin a velikostí listové plochy keře nebyla potvrzena (obrázek 20 Přílohy).

#### **4.2.3 Vliv velikosti listové plochy keře na hodnotu pH a poměr organických kyselin v hroznech**

##### **4.2.3.1 Pozorování u odrůdy Rulandské šedé**

Více než 90 % veškerých kyselin v hroznech je zastoupeno pouze kyselinou vinnou a jablečnou. V průběhu zrání se obsah kyselin snižuje, především díky kyselině jablečné, která je spotřebována jako zdroj energie při dýchání. Na obrázku 25 jsou znázorněny změny obou kyselin v průběhu dozrávání v roce 2008. Obsah kyseliny vinné se v termínu 5. 9. pohyboval mezi 10,47 a 10,88 g.l<sup>-1</sup> u všech tří variant. Na základě těchto údajů lze tedy konstatovat, že na její obsah neměla v tomto případě velikost listové plochy významný vliv. U kyseliny jablečné byl pozorován vliv velikosti listové plochy, její nejmenší množství obsahovaly hrozny u první varianty (5,30 ± 0,21 g.l<sup>-1</sup>) u druhé varianty byl obsah 6,10 ± 0,53 a u třetí 6,49 ± 0,78 g.l<sup>-1</sup>. V průběhu zrání docházelo ke snižování kyseliny jablečné v hroznech obdobně u všech variant. Zajímavým zjištěním byla klesající tendence obsahu kyseliny vinné, jejíž obsah by měl být relativně stálý.

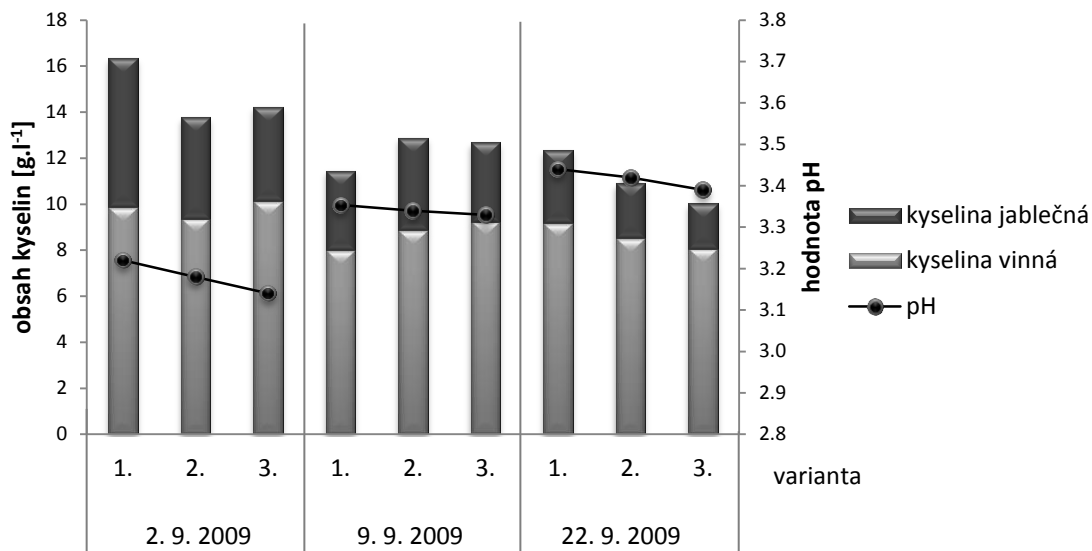
S přibývajícím dnem zrání se současně zvedala také hodnota pH v hroznech. Nejvyšší hodnota  $3,11 \pm 0,03$  byla zjištěna u první a druhé varianty v posledním termínu 22. 9. Tak jako poměr kyseliny jablečné a vinné, tak i hodnota pH nevykazovala významné rozdíly mezi jednotlivými variantami.



**Obrázek 25: Organické kyseliny a pH v hroznech odrůdy Rulandské šedé v roce 2008**

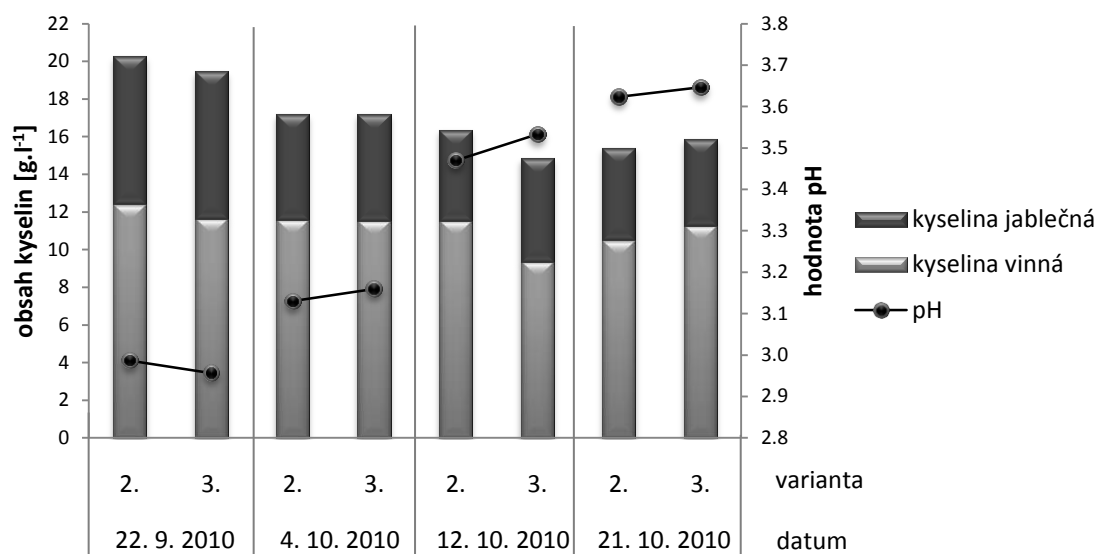
Zastoupení organických kyselin v hroznech se v roce 2009 lišilo v závislosti na variantě ošetření. I přesto, že obsah kyseliny vinné se postupem zrání snižoval, nebyl zjištěn významný rozdíl mezi jednotlivými variantami. Nejvyšší hodnotu kyseliny vinné ( $10,10 \pm 0,32 \text{ g.l}^{-1}$ ) obsahovaly hrozny u třetí varianty v prvním termínu odběru. Po 22 dnech zrání došlo u této varianty ke snížení o více než  $2 \text{ g.l}^{-1}$ , tato hodnota byla nejvyšší u všech sledovaných variant ošetření. Při pozorování obsahu kyseliny jablečné byly zjištěny významnější rozdíly v rámci jednotlivých variant. Hrozny, které obsahovaly nejvyšší hodnotu kyseliny jablečné, byly získané v prvním termínu odběru u první varianty a dosáhla hodnoty  $6,45 \pm 0,14 \text{ g.l}^{-1}$ . U této varianty byl také pozorován největší rozdíl mezi prvním a posledním termínem odběru, kdy došlo k celkovému snížení kyseliny jablečné o  $3,30 \text{ g.l}^{-1}$ . Naopak velmi nízký obsah kyseliny jablečné vykazovaly hrozny u třetí varianty v posledním termínu odběru ( $1,96 \pm 0,27 \text{ g.l}^{-1}$ ). Hodnoty pH hroznů byly v tomto roce poměrně vysoké u všech variant. Nejvyšší hodnoty byly pozorovány u první varianty ošetření, u které měly hrozny v období sklizně  $\text{pH } 3,44 \pm 0,01$ . Podobně vysoké hodnoty vykazovaly také hrozny u druhé varianty ( $3,42 \pm 0,01$ ). Nejnižší hodnota  $3,39 \pm 0,01$  byla naměřena u hroznů ve třetí

variantě ošetření. Z obrázku 26 je patrné, že hodnota pH se v průběhu zrání zvyšovala poměrně výrazně, u první varianty došlo za posledních 22 dnů zrání o navýšení hodnoty o 0,25.



**Obrázek 26: Organické kyseliny a pH v hroznech odrůdy Rulandské šedé v roce 2009**

V prvním termínu v roce 2010 byl obsah kyseliny vinné  $11,66 \pm 0,17 \text{ g.l}^{-1}$  u druhé varianty a  $12,42 \pm 0,21 \text{ g.l}^{-1}$  u třetí varianty, také obsah kyseliny jablečné byl u obou variant obdobný ( $7,85 \pm 0,16 \text{ g.l}^{-1}$  u druhé varianty a  $7,80 \pm 0,21 \text{ g.l}^{-1}$  u třetí varianty). V průběhu dozrávání docházelo ke snižování především obsahu kyseliny jablečné, mezi variantami však nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl. Na konci zrání obsahovaly hrozny ve druhé variantě  $10,50 \pm 0,25 \text{ g.l}^{-1}$  kyseliny vinné a  $4,90 \pm 0,25 \text{ g.l}^{-1}$  kyseliny jablečné, hrozny ve třetí variantě  $11,27 \pm 0,17 \text{ g.l}^{-1}$  kyseliny vinné a  $4,60 \pm 0,22 \text{ g.l}^{-1}$  kyseliny jablečné. Ze zobrazení průběhu změn organických kyselin v průběhu zrání, na obrázku 27, je zřejmé, že velikost listové stěny v tomto roce neměla významný vliv na poměr mezi sledovanými kyselinami. K velkým změnám docházelo u hodnoty pH hroznů. Hodnota v prvním termínu, která byla  $2,99 \pm 0,01$  u druhé varianty a  $2,96 \pm 0,01$  u třetí varianty, se po 29 dnech zrání zvýšila na  $3,62 \pm 0,01$  u druhé varianty a  $3,65 \pm 0,06$  u třetí varianty. Důvodem pro tak vysoké hodnoty pH by mohlo být zvýšené množství draslíku, případně jiných minerálů v bobulích. Draslík a další minerály mohou způsobovat neutralizaci přítomných kyselin do podoby solí (např. rozpuštěný hydrogenvinan draselný), disociace těchto solí naopak pH vína ještě více zvyšuje (BALÍK, 2005).



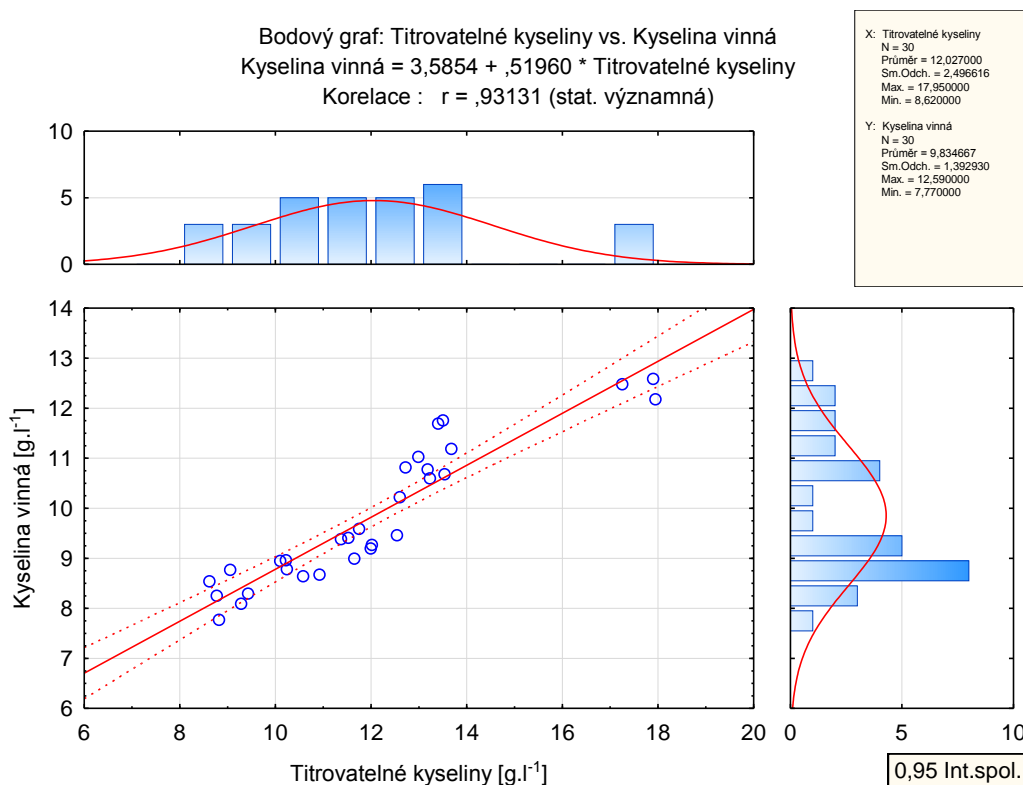
**Obrázek 27: Organické kyseliny a pH v hroznech odrůdy Rulandské šedé v roce 2010**

Pro porovnání vlivu kyseliny vinné a jablečné na obsah titrovatelných kyselin byly sestaveny bodové grafy (obrázek 1 až 5 Přílohy). Nejvyšší korelace byla zjištěna mezi obsahem kyseliny vinné a titrovatelných kyselin u druhé varianty. U této odrůdy byla vyšší korelace u kyseliny vinné než u kyseliny jablečné u všech tří sledovaných variant (tabulka 3, obrázek 28).

**Tabulka 3: Hodnoty korelačních koeficientů mezi obsahem titrovatelných kyselin, kyseliny vinné a jablečné v závislosti na velikosti listové plochy keře u odrůdy Rulandské šedé**

	1. varianta	2. varianta	3. varianta
<b>Kyselina vinná</b>	0,6929	<b>0,9313</b>	0,9162
<b>Kyselina jablečná</b>	0,6151	0,8432	0,7295

Pozn.: Červená čísla označují statisticky významnou hodnotu na hladině významnosti  $p = 0,05$



**Obrázek 28: Korelační analýza mezi obsahem kyseliny vinné a titrovatelných kyselin u hroznů odrůdy Rulandské šedé u druhé varianty ošetření**

V tabulce 4 jsou shrnuty údaje charakterizující poměry kyseliny vinné a jablečné u odrůdy Rulandské šedé. Nejvyšší poměr byl v roce 2009 u třetí varianty (4,12), naopak nejvíce se přibližovaly obsahy kyseliny vinné a jablečné v roce 2008 také u třetí varianty. Vliv velikosti listové plochy na poměr těchto dvou kyselin byl sledován pouze v roce 2009.

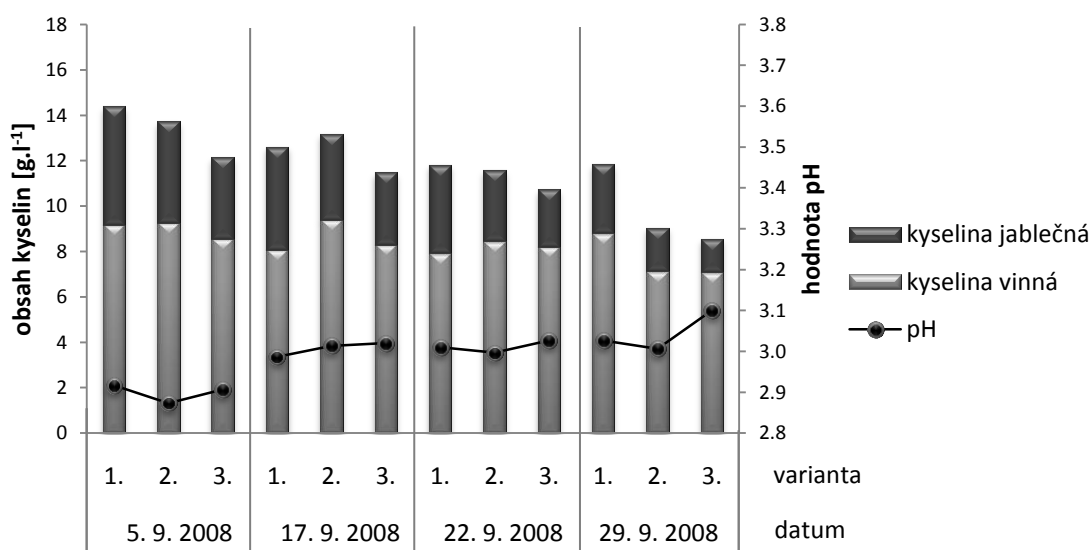
**Tabulka 4: Souhrn hodnot kyselin u hroznů odrůdy Rulandské šedé za celé experimentální období**

rok	varianta	poměr kyseliny vinné/jablečné	suma org. kyselin HPLC [g.l <sup>-1</sup> ]	titrovatelné kyseliny [g.l <sup>-1</sup> ]	pH
<b>2008</b> (22. 9.)	1	2,41	11,52 ± 0,18	9,0 ± 0,3	3,11 ± 0,01
	2	2,38	11,43 ± 0,19	9,2 ± 0,3	3,11 ± 0,01
	3	2,33	10,52 ± 0,25	8,6 ± 0,3	3,09 ± 0,03
<b>2009</b> (22. 9.)	1	2,92	12,32 ± 0,24	10,2 ± 0,3	3,37 ± 0,01
	2	3,57	10,91 ± 0,22	8,8 ± 0,2	3,42 ± 0,00
	3	4,12	10,02 ± 0,25	8,5 ± 0,4	3,39 ± 0,00
<b>2010</b> (21. 10)	2	2,45	15,87 ± 0,19	13,8 ± 0,2	3,65 ± 0,06
	3	2,41	16,35 ± 0,24	13,5 ± 0,1	3,47 ± 0,06

Pozn.: Hodnoty pochází z posledních odběru vzorků

#### 4.2.3.2 Pozorování u odrůdy Sauvignon

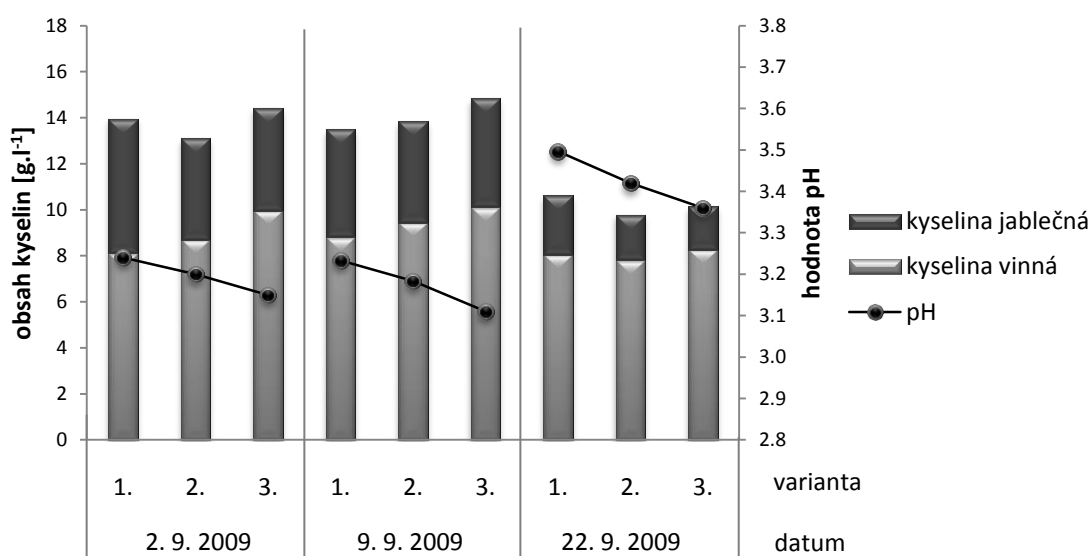
U odrůdy Sauvignon byl v roce 2008 zjištěn nejvyšší obsah kyseliny jablečné v hroznech u první varianty (ve všech termínech odběru). Nejvyšší hodnoty vykazovaly hrozny v prvním termínu odběru, u první varianty to bylo  $5,20 \pm 0,31 \text{ g.l}^{-1}$ , u druhé varianty  $4,44 \pm 0,05 \text{ g.l}^{-1}$  a u třetí  $3,58 \pm 0,18 \text{ g.l}^{-1}$  kyseliny jablečné. U druhé varianty došlo k nejvyššímu úbytku. Během 24 dnů zrání došlo ke snížení obsahu kyseliny jablečné v hroznech o  $2,50 \text{ g.l}^{-1}$ . Obsah kyseliny vinné se v průběhu zrání pohyboval v rozmezí  $7,10 - 9,40 \text{ g.l}^{-1}$ , nebyl však pozorován žádný vliv listové plochy na její obsah. Hodnota pH hroznů se pohybovala ve velmi nízkých hodnotách. Na počátku pozorování byla hodnota pH hroznů u všech variant  $2,90 \pm 0,01$ . Postupně, při zrání, docházelo k velmi pozvolnému narůstání, přičemž nejvyšší hodnotu na konci pozorování měly hrozny ve třetí variantě (3,10). Podrobné hodnoty v průběhu zrání znázorňuje obrázek 29.



Obrázek 29: Organické kyseliny a pH v hroznech odrůdy Sauvignon v roce 2008

V roce 2009 byla pozorována závislost vlivu intenzity zakracování letorostů na obsah kyseliny vinné. Ve všech termínech odběrů obsahovaly hrozny na keřích s nejmenší listovou plochou nejvíce kyseliny vinné. U této varianty došlo také k nejvyššímu snížení, v posledních 20 dnech zrání, její hodnota klesla o  $1,69 \text{ g.l}^{-1}$ . V ostatních variantách nebyl pozorován významný pokles v obsahu kyseliny vinné v hroznech v průběhu pozorování (obrázek 30). Nejvíce kyseliny jablečné bylo zjištěno

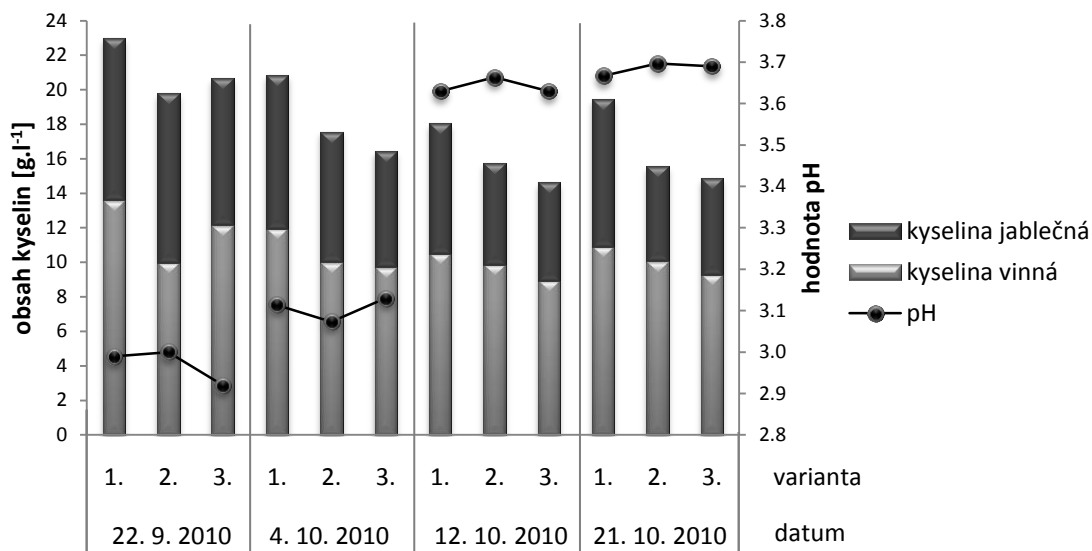
naopak u první varianty. Její obsah se v průběhu dozrávání postupně snižoval u všech variant. Nejvýraznější pokles byl zaznamenán právě u první varianty, kde z původní hodnoty  $5,83 \pm 0,30 \text{ g.l}^{-1}$  po 20 dnech zrání klesla hodnota na  $2,54 \pm 0,14 \text{ g.l}^{-1}$ . Hodnota pH hroznů byla pravděpodobně ovlivněna silou jednotlivých kyselin v nich zastoupených. Kyselina vinná má hodnotu záporného dekadického logaritmu disociační konstanty ( $pK_a$ ) 2,98, kyselina jablečná má hodnotu vyšší (3,4), proto oproti kyselině vinné snižuje hodnotu pH méně.



**Obrázek 30: Organické kyseliny a pH v hroznech odrůdy Sauvignon v roce 2009**

Obsah kyselin zastoupených v hroznech byl v roce 2010 charakteristický vysokým obsahem kyseliny jablečné, její obsah se na rozdíl od kyseliny vinné v průběhu zrání může výrazně měnit v závislosti na sumě aktivních teplot. Nejmenší poměr mezi kyselinou vinnou a jablečnou byl v hroznech druhé varianty v prvním termínu odběru, obsah kyseliny vinné ( $9,90 \pm 0,17 \text{ g.l}^{-1}$ ) byl téměř stejný jako obsah kyseliny jablečné ( $9,80 \pm 0,1 \text{ g.l}^{-1}$ ). U druhé varianty byl také sledován nejvyšší pokles kyseliny jablečné, po 29 dnech zrání se její obsah snížil o  $4,4 \text{ g.l}^{-1}$  na hodnotu  $5,46 \pm 0,1 \text{ g.l}^{-1}$ . Naopak nejméně se obsah kyseliny jablečné v hroznech snižoval u první varianty. Její hodnota v hroznech klesla pouze o  $0,90 \text{ g.l}^{-1}$ , takže v posledním termínu odběru byl její obsah v hroznech velmi vysoký  $8,54 \pm 0,27 \text{ g.l}^{-1}$ . Změny byly zjištěny v hodnotě pH hroznů, zatímco v prvním odběru se pohybovala u hodnoty 3,00 u všech variant, u třetího odběru již měly hrozny všech variant hodnotu vyšší než 3,60

a v posledním termínu dokonce ve druhé variantě hodnotu  $3,70 \pm 0,01$ . Změny organických kyselin a pH v hroznech jednotlivých variant znázorňuje obrázek 31.



**Obrázek 31: Organické kyseliny a pH v hroznech odrůdy Sauvignon v roce 2010**

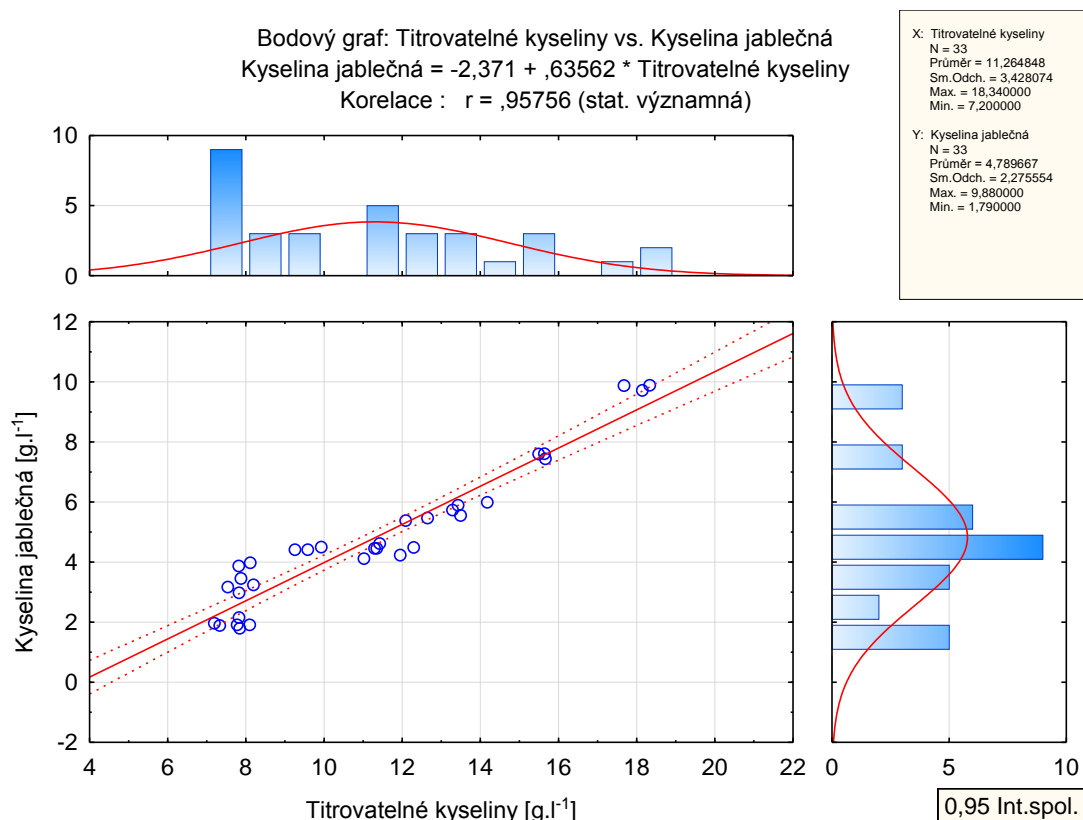
Na rozdíl od odrůdy Rulandské šedé, kde byly potvrzeny vyšší hodnoty korelačních koeficientů mezi obsahem titrovatelných kyselin, u odrůdy Sauvignon byly u všech variant zjištěny vyšší hodnoty korelačních koeficientů u kyseliny jablečné (tabulka 5, tabulky 7 až 12 Přílohy). Nejvyšší hodnota korelačního koeficientu byla potvrzena u první varianty (obrázek 32).

**Tabulka 5: Hodnoty korelačních koeficientů mezi obsahem titrovatelných kyselin, kyseliny vinné a jablečné v závislosti na velikosti listové plochy keře u hroznů odrůdy Sauvignon**

	1. varianta	2. varianta	3. varianta
Kyselina vinná	0,9162	0,7305	0,9121
Kyselina jablečná	<b>0,9585</b>	0,9576	0,9362

Pozn.: Červená čísla označují statisticky významnou hodnotu na hladině významnosti  $p = 0,05$





**Obrázek 32: Korelační analýza mezi obsahem kyseliny jablečné a titrovatelných kyselin u hroznů odrůdy Sauvignon u druhé varianty ošetření**

Poměr kyseliny vinné k jablečné byl nejvyšší v roce 2008 u první varianty, nejmenší byl v roce 2010 také u první varianty (tabulka 6). Obsah organických kyselin stanovený metodou HPLC byl ve všech případech vyšší než titrovatelné kyseliny.

**Tabulka 6: Souhrn hodnot kyselin u hroznů odrůdy Sauvignon za celé experimentální období**

rok	varianta	poměr kyseliny vinné/jablečné	suma org. kyselin HPLC [g.l <sup>-1</sup> ]	titrovatelné kyseliny [g.l <sup>-1</sup> ]	pH
<b>2008</b> (29. 9.)	1	4,90	8,56 ± 0,30	6,9 ± 0,3	3,03 ± 0,01
	2	3,75	9,04 ± 0,21	7,7 ± 0,4	3,01 ± 0,01
	3	2,90	11,85 ± 0,38	8,4 ± 0,5	3,10 ± 0,05
<b>2009</b> (22. 9.)	1	3,18	10,62 ± 0,22	8,6 ± 0,2	3,49 ± 0,01
	2	3,98	9,79 ± 0,22	7,6 ± 0,4	3,56 ± 0,01
	3	4,42	10,15 ± 0,29	8,3 ± 0,3	3,36 ± 0,01
<b>2010</b> (21. 10)	1	1,28	19,46 ± 0,25	17,2 ± 0,8	3,67 ± 0,01
	2	1,84	15,54 ± 0,14	12,8 ± 0,7	3,69 ± 0,01
	3	1,68	14,86 ± 0,20	12,4 ± 0,3	3,69 ± 0,01

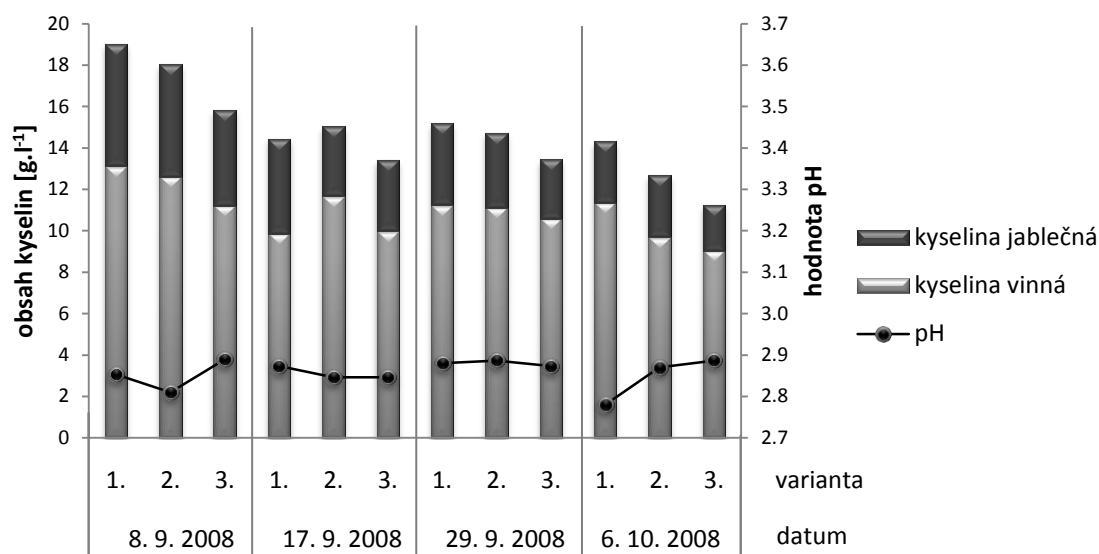
Pozn.: Hodnoty pochází z posledních odběru vzorků

### ***Pozorování u odrůdy Ryzlink rýnský***

V zastoupení organických kyselin v hroznech v roce 2008 nebyl zjištěn významný vliv velikosti listové plochy. Hrozny ve všech sledovaných variantách obsahovaly velmi podobné hodnoty kyseliny vinné i kyseliny jablečné. Nejvíce kyseliny vinné bylo v hroznech první varianty v prvním termínu odběru ( $13,12 \pm 0,07 \text{ g.l}^{-1}$ ), druhý nejvyšší obsah měly hrozny ve druhé variantě ( $12,62 \pm 0,39 \text{ g.l}^{-1}$ ) a nejméně bylo zjištěno v hroznech třetí varianty ( $11,23 \pm 0,17 \text{ g.l}^{-1}$ ). V termínu sklizně si zachovaly hrozny stejný trend v obsahu kyseliny vinné na variantě ošetření, avšak u všech došlo ke snížení jejího obsahu ( $11,35 \pm 0,05 \text{ g.l}^{-1}$  u první,  $9,71 \pm 0,20 \text{ g.l}^{-1}$  u druhé a  $9,05 \pm 0,11 \text{ g.l}^{-1}$  u třetí varianty).

V prvním termínu obsahovaly nejvíce kyseliny jablečné, stejně jako kyseliny vinné, hrozny v první variantě ( $5,89 \pm 0,16 \text{ g.l}^{-1}$ ), ve druhé variantě hrozny obsahovaly o 0,50 a ve třetí o 1,29  $\text{g.l}^{-1}$  méně. V průběhu sledování došlo ke snížení obsahu kyseliny jablečné na hodnotu  $2,21 \pm 0,16 \text{ g.l}^{-1}$  u třetí varianty a shodně  $2,95 \text{ g.l}^{-1}$  u první a druhé varianty.

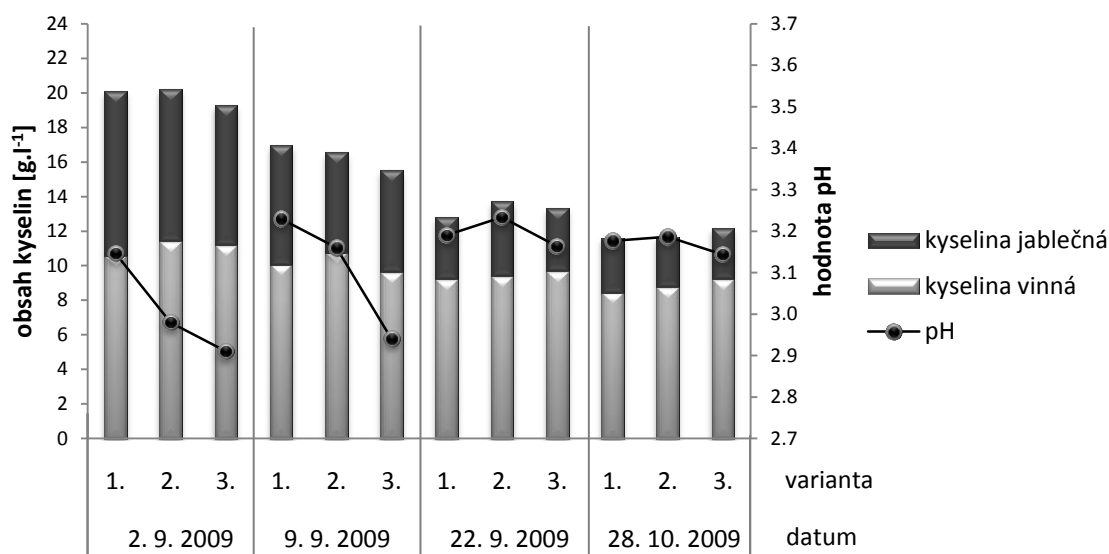
Hodnota pH se v průběhu zrání pohybovala ve velmi nízkých hodnotách a u žádného vzorku nebyla přesáhnuta hodnota 2,90. V hodnotách pH hroznů nebyl pozorován jasný trend závislosti na listové ploše. Podrobné hodnoty organických kyseliny a hodnot pH znázorňuje obrázek 33.



**Obrázek 33: Organické kyseliny a pH v hroznech odrůdy Ryzlink rýnský v roce 2008**

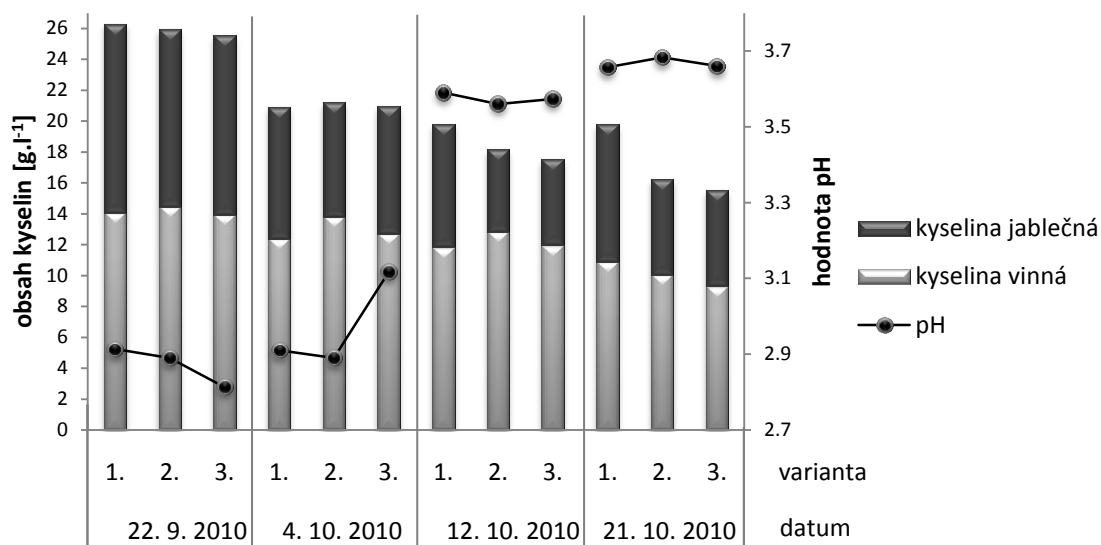
V roce 2009 obsahovaly hrozny podobné obsahy kyselin jako v předchozím roce, ovšem v rozdílném poměru zastoupení kyseliny vinné a jablečné (obrázek 34). Především v prvním a druhém termínu odběru byl zjištěn vyšší obsah kyseliny jablečné (nejvyšší obsah byl zaznamenán u první varianty -  $9,49 \pm 0,31 \text{ g.l}^{-1}$ ). V období sklizně však již hrozny u všech tří variant obsahovaly výrazně nižší obsahy kyseliny jablečné ( $3,14 \pm 0,31 \text{ g.l}^{-1}$  u první varianty a  $2,90 \pm 0,22 \text{ g.l}^{-1}$  u druhé a třetí varianty). V tomto roce obsahovaly hrozny ve všech variantách velmi podobné hodnoty kyseliny vinné i jablečné a nebyl potvrzen vliv intenzity zakracování letorostů na jejich zastoupení.

Pokud bychom porovnali hodnoty pH hroznů s předchozím rokem, tak došlo k podstatně výraznějším odchylkám než v obsahu organických kyselin. Zejména hrozny v první variantě měly ve všech termínech odběru poměrně vysokou hodnotu  $3,20 \pm 0,01$ . Hodnota pH u hroznů ve třetí variantě byla u prvních dvou odběrů nízká (2,90), ale na konci zrání již také přesáhla hodnotu  $3,10 \pm 0,01$ . Podrobné hodnoty jsou zobrazeny na obrázku 24.



**Obrázek 34: Organické kyseliny a pH v hroznech odrůdy Ryzlink rýnský v roce 2009**

Stejně jako v předchozím roce, tak i v roce 2010 hrozny v prvním termínu odběru obsahovaly vysoké hodnoty kyseliny jablčné. Poměr kyseliny vinné ke kyselině jablčné se u hroznů všech tří variant pohyboval v rozmezí 1,20 až 1,65. Tento poměr se v průběhu zrání zvyšoval a v posledním termínu byl obsah kyseliny vinné ke kyselině jablčné téměř 2:1, u první varianty byl však stále velmi nízký (1,3) (tabulka 8). Určitá analogie v zastoupení kyseliny vinné a jablčné v hroznech v posledních dvou letech sledování se nepotvrdila u hodnoty pH. Poměrně nízké hodnoty v prvním termínu, které se pohybovaly mezi hodnotami 2,80 – 2,90 v průběhu dozrávání významně narostly a na konci pozorování dosahovaly hranice 3,70. Především mezi druhým a třetím termínem odběru došlo k extrémnímu nárůstu této hodnoty. Jak lze vidět na obrázku 35, v rámci jednotlivých variant nebyl pozorován významný rozdíl. Výjimku představovala třetí varianta, u které byl pozorován značnější nárůst hodnoty pH v hroznech již mezi prvním a druhým termínem odběru.



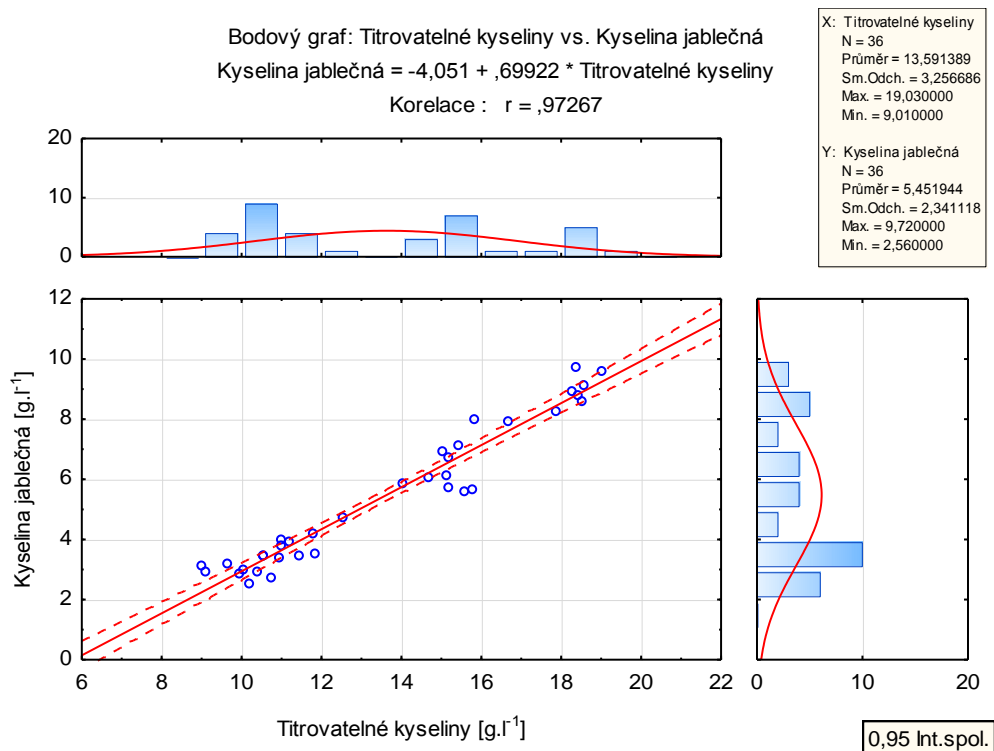
**Obrázek 35: Organické kyseliny a pH v hroznech odrůdy Ryzlink rýnský v roce 2010**

Stejná korelační závislost jako u odrůdy Sauvignon byla potvrzena také u odrůdy Ryzlink rýnský, nejvyšší korelační koeficient byl zjištěn mezi obsahem titrovatelných kyselin a kyselinou jablečnou u první varianty (tabulka 7, obrázek 36, tabulky 13 až 17 Přílohy).

**Tabulka 7: Hodnoty korelačních koeficientů mezi obsahem titrovatelných kyselin, kyseliny vinné a jablečné v závislosti na velikosti listové plochy keře u odrůdy Ryzlink rýnský**

	1. varianta	2. varianta	3. varianta
Kyselina vinná	0,7172	0,8357	0,8859
Kyselina jablečná	<b>0,9688</b>	0,9473	0,9517

Pozn.: Červená čísla označují statisticky významnou hodnotu na hladině významnosti  $p = 0,05$



**Obrázek 36: Korelační analýza mezi obsahem kyseliny jablečné a titrovatelných kyselin u hroznů odrůdy Ryzlink rýnský u druhé varianty ošetření**

U odrůdy Ryzlink rýnský byly nejmenší poměry obsahu kyseliny vinné k jablečné v roce 2010 stejně jako u odrůdy Sauvignon. Nejmenší poměr byl sledován u první varianty ošetřen. Nejvyšší poměr byl v roce 2008 u první varianty (tabulka 8).

**Tabulka 8: Souhrn hodnot kyselin u odrůdy Ryzlink rýnský za celé experimentální období**

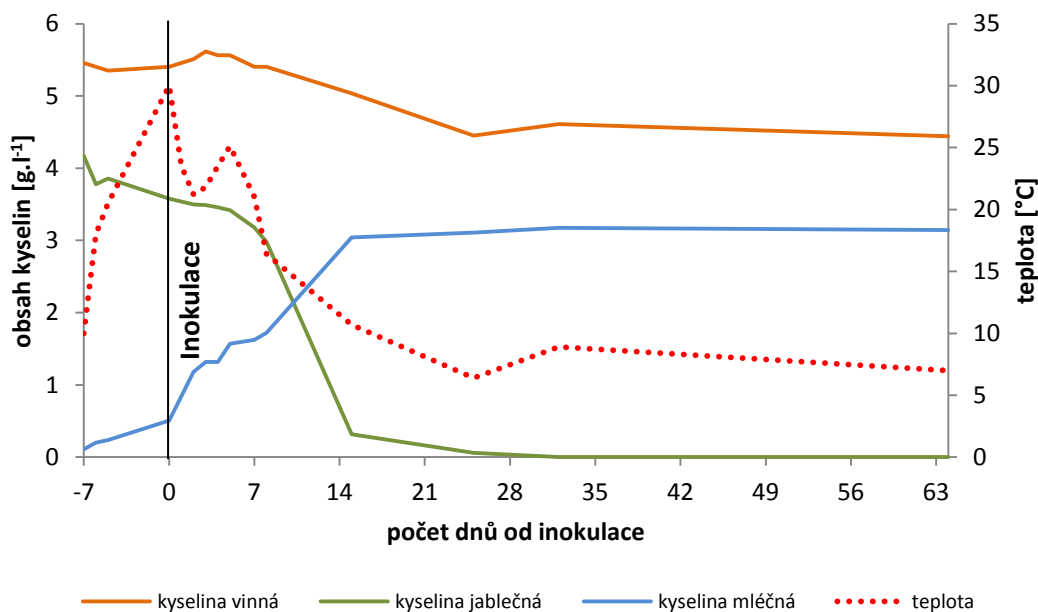
rok	varianta	poměr kyseliny vinné/jablečné	obsah org. kyselin HPLC [g.l <sup>-1</sup> ]	titrovatelné kyseliny [g.l <sup>-1</sup> ]	pH
<b>2008</b> (6. 10.)	1	3,84	14,31 ± 0,17	11,7 ± 0,3	2,78 ± 0,01
	2	3,29	12,66 ± 0,14	10,9 ± 0,4	2,87 ± 0,01
	3	4,10	11,25 ± 0,11	11,3 ± 0,1	2,89 ± 0,01
<b>2009</b> (28. 9.)	1	2,69	11,59 ± 0,54	10,3 ± 0,3	3,18 ± 0,01
	2	3,02	11,64 ± 0,22	9,6 ± 0,6	3,19 ± 0,01
	3	3,18	12,14 ± 0,19	9,9 ± 0,9	3,14 ± 0,01
<b>2010</b> (21. 10.)	1	1,23	19,79 ± 0,38	17,2 ± 1,2	3,66 ± 0,03
	2	1,65	16,21 ± 0,55	13,1 ± 0,3	3,68 ± 0,03
	3	1,50	15,52 ± 0,48	12,8 ± 0,4	3,66 ± 0,05

Pozn.: Hodnoty pochází z posledního odběru vzorků

### 4.3 Hodnocení jakostních parametrů červených vín v průběhu jablečno-mléčné fermentace

#### 4.3.1 Vliv použitého inokulačního preparátu na změny organických kyselin

*Pozorování v roce 2008*



**Obrázek 37: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Frankovka, při použití preparátu Lalvin 31**

Délka jablečno-mléčné fermentace je ovlivněna chemickými vlastnosti daného vína jako jsou hodnota pH, obsah alkoholu a obsah oxidu siřičitého. Bakterie mléčného kvašení se od sebe liší ve schopnosti tolerovat a přežít podmínky, které jsou ve víně (LERM et al. 2010).

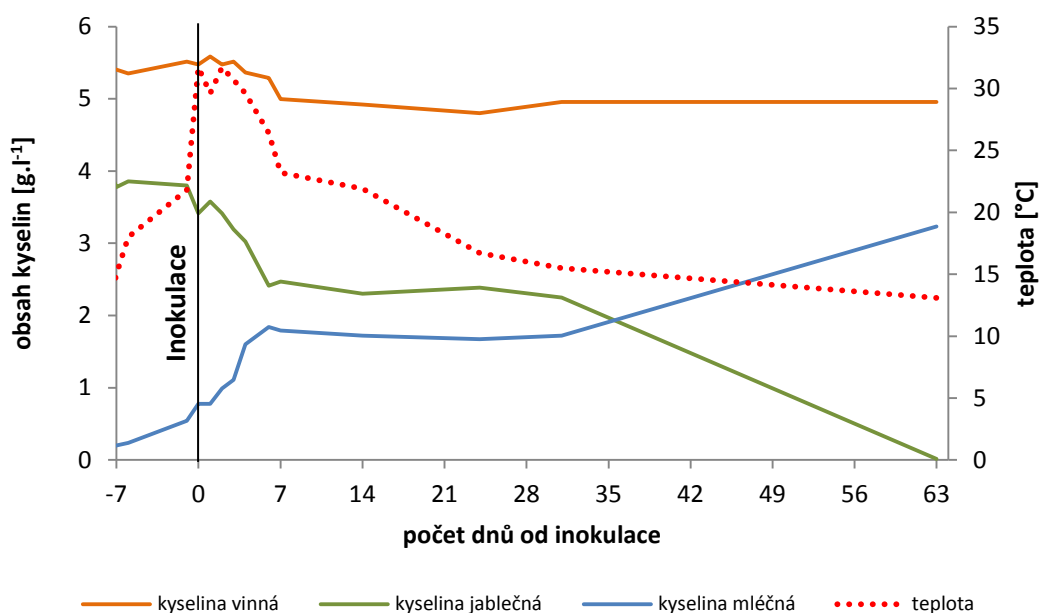
V roce 2008 došlo k úplnému odbourání kyseliny jablečné u obou sledovaných vín. Ke snižování obsahu kyseliny jablečné a následné přeměně na kyselinu mléčnou docházelo pozvolna již před inokulací preparátů do vína. Jak lze pozorovat z obrázku 37, použití přípravku Lalvin 31 urychlilo proces odbourávání kyseliny jablečné. V prvním tanku došlo k téměř kompletnímu odbourání kyseliny jablečné během 14 dnů po inokulaci, kdy došlo ke snížení jejího obsahu z původní hodnoty  $4,20 \pm 0,04 \text{ g.l}^{-1}$  na  $0,32 \pm 0,02 \text{ g.l}^{-1}$ . Současně s odbouráváním kyseliny jablečné docházelo ke tvorbě kyseliny mléčné, jejíž obsah se po 14 dnech od inokulace zvýšil o  $2,50 \text{ g.l}^{-1}$ . U kyseliny

vinné došlo v průběhu pozorování také k úbytku, její obsah se během 63 dnů od inokulace snížil o  $0,90 \text{ g.l}^{-1}$ .

Účinnost přípravku Lalvin 31 sledovali také MAIN et al. (2007) u vína vyrobeného z odrůdy Vingoles. Ve své studii porovnávali rychlost odbourávání kyseliny jablečné na mléčnou. Při použití přípravku Lalvin 31 došlo k odbourání veškeré kyseliny jablečné během 21 dnů od inokulace. SUN et al. (2013) uvádí délku jablečno-mléčné fermentace při použití inokulačních kultur Lalvin 31 v rozmezí 16 až 19 dnů.

Ve druhém tanku, kde bylo víno ošetřeno preparátem BioStart Vitale SK11 trvalo odbourávání kyseliny jablečné delší dobu (obrázek 38). Prvních 7 dnů od inokulace docházelo k poměrně rychlému rozkladu kyseliny jablečné, ale když její koncentrace klesla na hranici  $2,47 \pm 0,05 \text{ g.l}^{-1}$ , odbourávání se zpomalilo a až ve 31 dnu se postupně začala koncentrace kyseliny jablečné opět snižovat. Množství vytvořené kyseliny mléčné po odbourání veškeré kyseliny jablečné bylo  $3,23 \pm 0,12 \text{ g.l}^{-1}$ . O využití přípravku BioStart Vitale SK11 se zabývá minimální množství vědeckých prací. ČUŠ (2013) ve své práci porovnává obsah kyselin jablečné ve vínech odrůdy Frankovka ošetřených a neošetřených pomocí jablečno-mléčné fermentace. Vína odbouraná s přidavkem selektovaných kmenů bakterií obsahovala  $0,19 \pm 0,03 \text{ g.l}^{-1}$  kyseliny jablečné, vína neodbouraná  $2,28 \pm 0,07 \text{ g.l}^{-1}$  kyseliny jablečné z počáteční hodnoty  $2,91 \pm 0,09 \text{ g.l}^{-1}$ . Konečné obsahy kyseliny mléčné byly v odbouraném víně  $2,05 \pm 0,02$  a v neodbouraném  $0,40 \pm 0,01 \text{ g.l}^{-1}$ .





**Obrázek 38: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Frankovka, při použití preparátu BioStart Vitale SK11**

Nejvyšší teploty bylo dosaženo ve všech tancích při inokulaci preparáty. Teplota v tomto období dosahovala hranice 30°C. Po inokulaci bylo zahřívání vína ukončeno a teplota pozvolně klesala v závislosti na intenzitě probíhajícího odbourávání. V prvním tanku bylo pozorováno mírné navýšení teploty v sedmém dnu od inokulace, tento výkyv byl pravděpodobně způsoben zvýšenou intenzitou metabolických procesů bakterií mléčného kvašení. Po 63 dnech od inokulace byla nižší teplota vína v prvním tanku (7 °C), ve kterém proběhlo odbourávání v kratší době. Vyšší teplota byla zaznamenána ve druhém tanku (13,1 °C), kde bylo odbourávání pomalejší a pravděpodobně ještě probíhalo. Vyšší teplota je spojena se zvýšenou aktivitou bakterií mléčného kvašení, proto křivka teploty kopíruje křivku obsahu kyseliny jablečné. Vliv teploty vína při jablečno-mléčné fermentaci sledoval REQUANT et al. (2002). Výsledky jeho práce potvrzují, že řízená teplota 22 °C a provzdušňování vína přispělo k vyššímu nárůstu populací mléčných bakterií ve víně.

V tabulce 9 jsou zobrazeny hodnoty kyseliny jablečné a mléčné v závislosti na použitém preparátu mléčných bakterií. Doba odbourání kyseliny mléčné byla rychlejší u preparátu Lalvin 31, ale z pohledu množství vytvořené kyseliny mléčné byl účinnější preparát BioStart Vitale SK11.

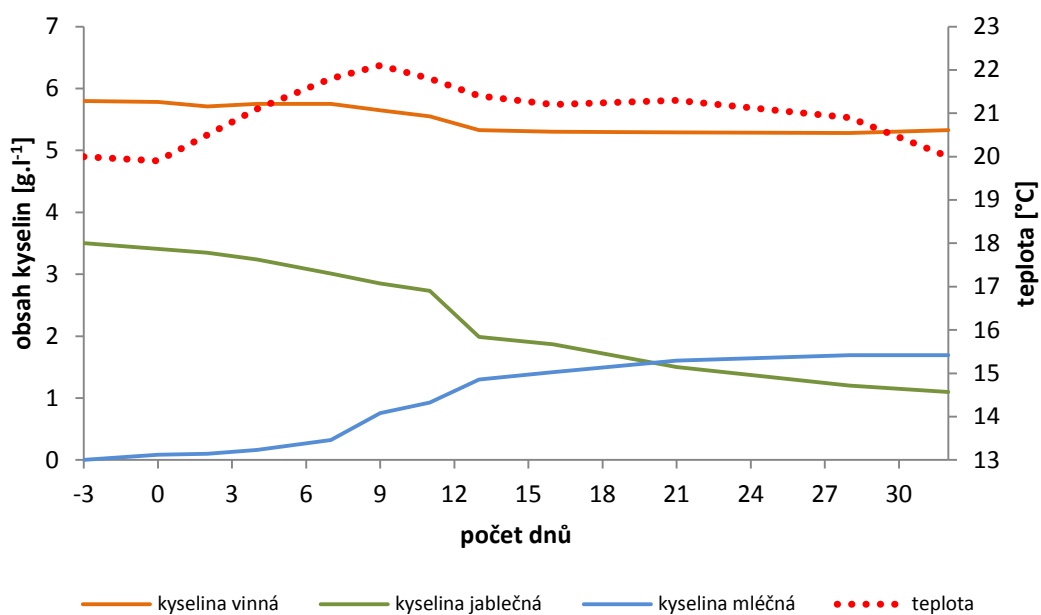
**Tabulka 9: Souhrnná tabulka k hodnotám kyseliny jablečné a mléčné u vín odrůdy Frankovka v roce 2008**

	<b>Lalvin 31</b>	<b>BioStart Vitale SK11</b>
obsah kyseliny jablečné před JMF	4,17 ± 0,04	3,89 ± 0,10
obsah kyseliny jablečné po JMF	< 0,10	< 0,10
obsah kyseliny mléčné po JMF	3,14 ± 0,09	3,23 ± 0,12
poměr kyseliny mléčné/jablečné*	0,75	0,83
délka JMF	25 dnů	63 dnů

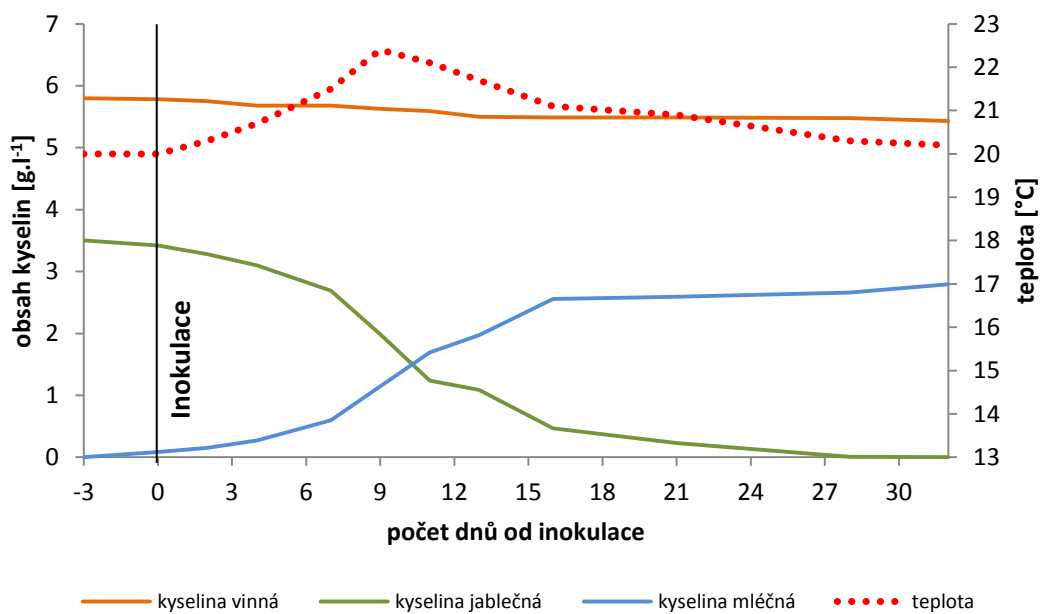
\*udává poměr kyseliny mléčné po JMF ke kyselině jablečné před JMF

### **Pozorování v roce 2009**

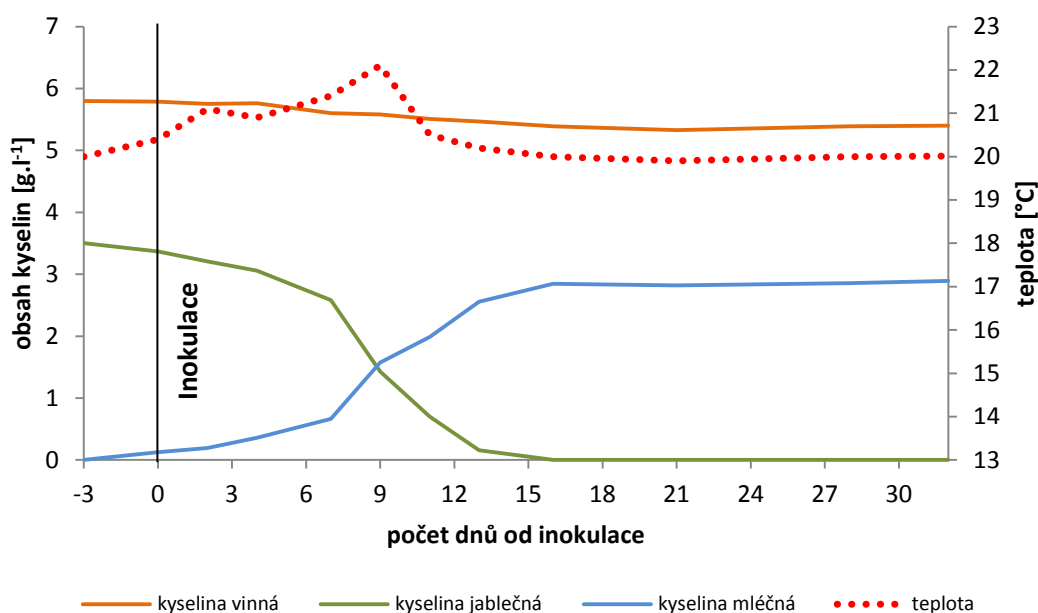
V roce 2009 byly sledovány odrůdy Frankovka a Merlot. Oproti minulému experimentálnímu roku byla sledována i varianta, ve které bylo víno ponecháno spontánnímu odbourávání bez přídavku mléčných bakterií. Nejrychlejší průběh jablečno-mléčné fermentace byl sledován u vína s přídavkem preparátu Viniflora CH35 (tabulka 13). V 16. dnu od inokulace již víno neobsahovalo žádnou kyselinu jablečnou a obsah vytvořené kyseliny mléčné byl  $2,89 \pm 0,09 \text{ g.l}^{-1}$ . Při použití tohoto preparátu došlo ke snížení obsahu kyseliny vinné za 32 dnů od inokulace o  $0,40 \text{ g.l}^{-1}$ . Ve víně s přídavkem kultury Viniflora Oenos došlo k odbourání kyseliny jablečné během 28 dnů od inokulace. Obsah kyseliny mléčné po 32 dnech byl  $2,79 \pm 0,11 \text{ g.l}^{-1}$ , tedy o  $0,10 \text{ g.l}^{-1}$  méně než u přípravku CH35. Víno, které nebylo inokulováno bakteriemi, odbouralo po 32 dnech  $2,40 \text{ g.l}^{-1}$  kyseliny jablečné z původního obsahu  $3,5 \pm 0,08 \text{ g.l}^{-1}$  a obsahovalo  $1,70 \pm 0,02 \text{ g.l}^{-1}$  kyseliny mléčné. Vývoj teplot vína byl v průběhu jablečno-mléčné fermentace obdobný u všech sledovaných variant. Změny v obsahu jednotlivých kyselin jsou znázorněny na obrázcích 39 až 41.



Obrázek 39: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Frankovka, bez inokulace mléčnými bakteriemi



Obrázek 40: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Frankovka, při použití preparátu Viniflora Oenos



**Obrázek 41: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Frankovka, při použití preparátu Viniflora CH35**

**Tabulka 10: Souhrnná tabulka k hodnotám kyseliny jablečné a mléčné u vín odrůdy Frankovka v roce 2009**

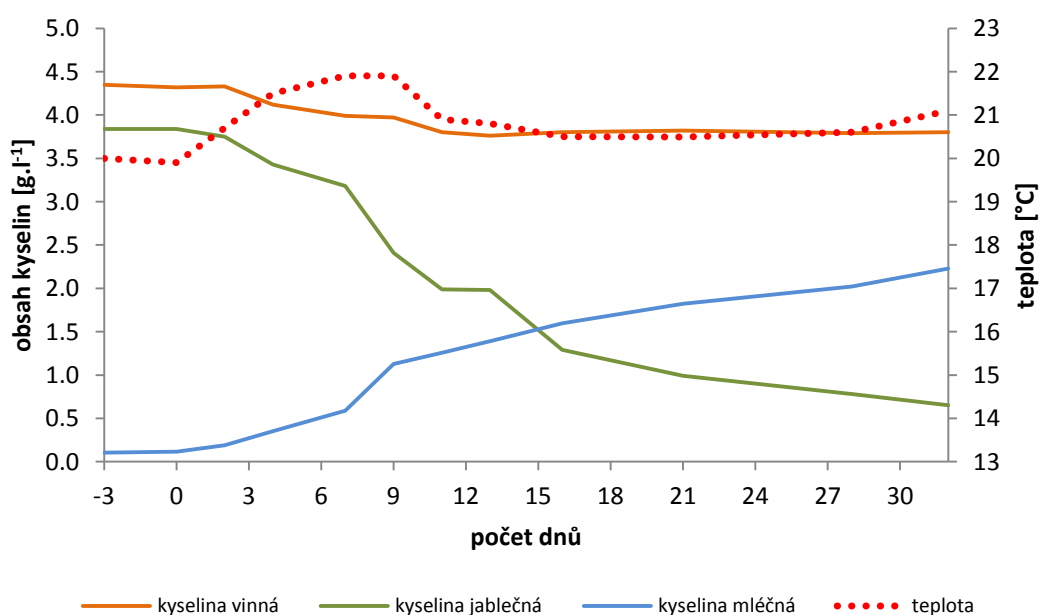
	spontánní odb.	Viniflora Oenos	Viniflora CH35
obsah kyseliny jablečné před JMF	3,50 ± 0,08	3,50 ± 0,08	3,50 ± 0,08
obsah kyseliny jablečné po JMF	1,10 ± 0,13	< 0,10	< 0,10
obsah kyseliny mléčné po JMF	1,65 ± 0,02	2,79 ± 0,11	2,89 ± 0,09
poměr kyselin mléčné/jablečné*	0,47	0,80	0,83
délka JMF	32**	28 dnů	16 dnů

\*udává poměr kyseliny mléčné po JMF ke kyselině jablečné před JMF

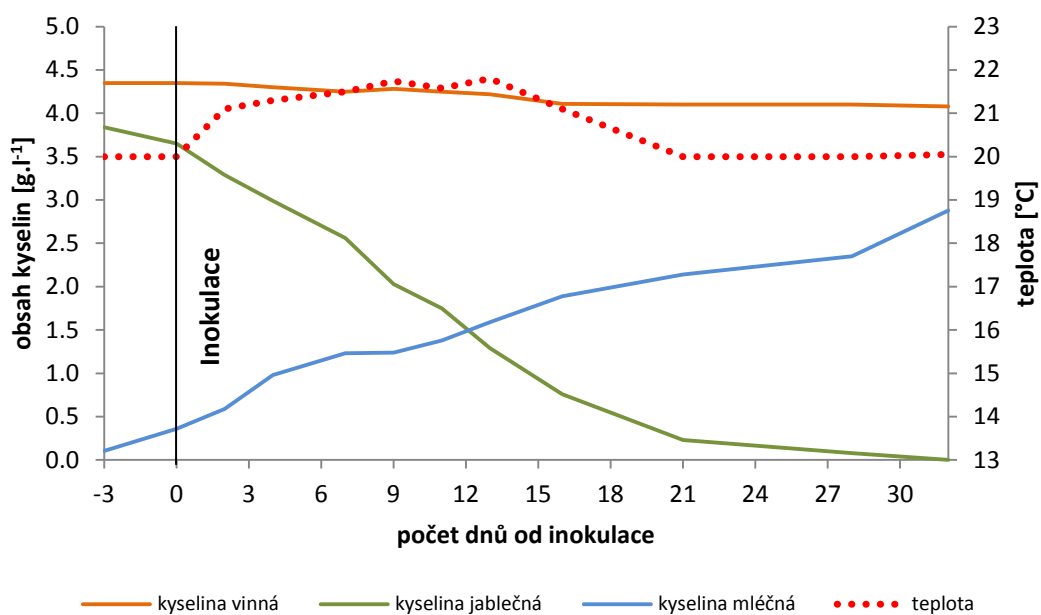
\*\* Po uplynutí 32 dnů nedošlo k odbourání veškeré kyseliny jablečné

V dalším experimentu bylo sledováno víno odrůdy Merlot, u kterého proběhlo nejrychleji odbourání kyseliny jablečné, stejně jako u vína odrůdy Frankovka, při použití preparátu Viniflora CH35. Toto víno vykazovalo po 16 dnech od inokulace nulový obsah kyseliny jablečné. Z původního obsahu  $3,84 \pm 0,15 \text{ g.l}^{-1}$  kyseliny jablečné bylo vytvořeno celkem  $2,90 \pm 0,04 \text{ g.l}^{-1}$  kyseliny mléčné, obdobně jako u přípravku Viniflora Oenos (tabulka 11). V průběhu 33 dnů odbourávání došlo k poklesu kyseliny vinné o  $0,23 \text{ g.l}^{-1}$ . U vína s preparátem Viniflora Oenos probíhala jablečno-mléčná fermentace pozvolněji a k úplnému odbourání kyseliny jablečné došlo po delší době, než u předchozího preparátu. Kyselina jablečná byla kompletně odbourána až 32. den od inokulace což je pomalejší průběh než uvádí BURNS a OSBORNE (2013). Ve své

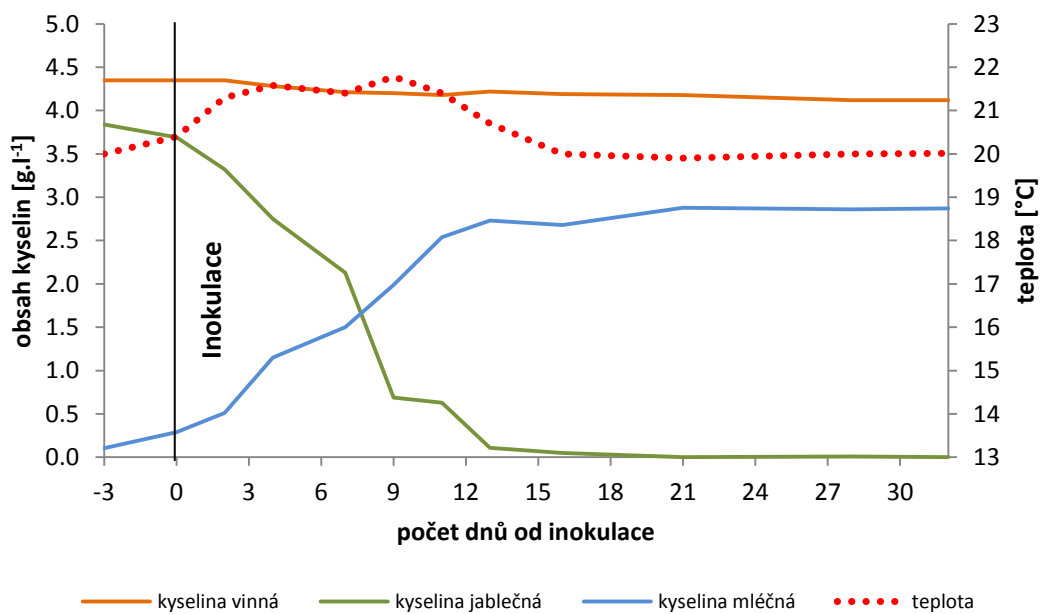
studii uvádí celkovou délku jablečno-mléčné fermentace, u odrůdy Merlot při použití stejného preparátu, 13 dnů. S preparátem Viniflora Oenos bylo ve víně vytvořeno stejné množství kyseliny mléčné jako při použití preparátu Viniflora CH35. Obsah kyseliny vinné se snížil o  $0,27 \text{ g.l}^{-1}$ . Nejdéle trvalo odbourávání u spontánního průběhu, kdy ani ve 33. dnu nedošlo k degradaci veškeré kyseliny jablečné. Víno jí obsahovalo na konci sledování  $0,70 \pm 0,03 \text{ g.l}^{-1}$ , kyseliny mléčné  $2,20 \pm 0,1 \text{ g.l}^{-1}$ . U této varianty byla také naměřena nejvyšší teplota na konci experimentu ( $21,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Jedním ze způsobů, jak urychlit průběh jablečno-mléčné fermentace, by mohlo být využití metody simultánní inokulace kvasinek a mléčných bakterií. U odrůdy Merlot tento postup sledoval CAÑAS et al. (2012) a výsledky jeho studií ukazují, že došlo tímto způsobem o zkrácení doby alkoholového kvašení a jablečno-mléčné fermentace o 9 až 20 dnů v závislosti na odrůdě a kmenu použitých kvasinek/bakterií. Což se shoduje také s výsledky dalších autorů (AZZOLINI et al., 2010; JUSSIER et al., 2006; SEMON et al., 2001). Na obrázcích 42 až 44 jsou znázorněny podrobné změny v obsahu organických kyselin.



**Obrázek 42:** Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Merlot, bez inokulace mléčnými bakteriemi



**Obrázek 43:** Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Merlot, při použití preparátu Viniflora Oenos



**Obrázek 44:** Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Merlot, při použití preparátu Viniflora CH35

**Tabulka 11: Tabulka 11: Souhrnná tabulka k hodnotám kyseliny jablečné a mléčné u vín odrůdy Merlot v roce 2009**

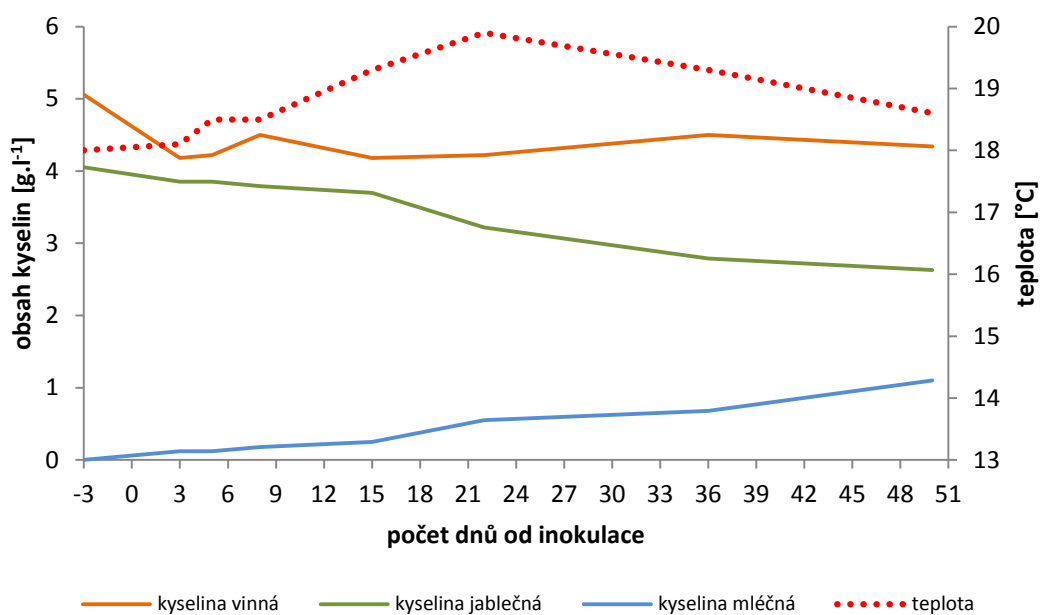
	bez bakterií	Viniflora Oenos	Viniflora CH35
<b>obsah kyseliny jablečné před JMF</b>	3,84 ± 0,15	3,84 ± 0,15	3,84 ± 0,15
<b>obsah kyseliny jablečné po JMF</b>	0,65 ± 0,03	< 0,10	< 0,10
<b>obsah kyseliny mléčné po JMF</b>	2,23 ± 0,10	2,88 ± 0,06	2,87 ± 0,04
<b>poměr kyselin mléčné/jablečné*</b>	0,58	0,75	0,75
<b>délka JMF</b>	32**	32 dnů	16 dnů

\*udává poměr kyseliny mléčné po JMF ke kyselině jablečné před JMF

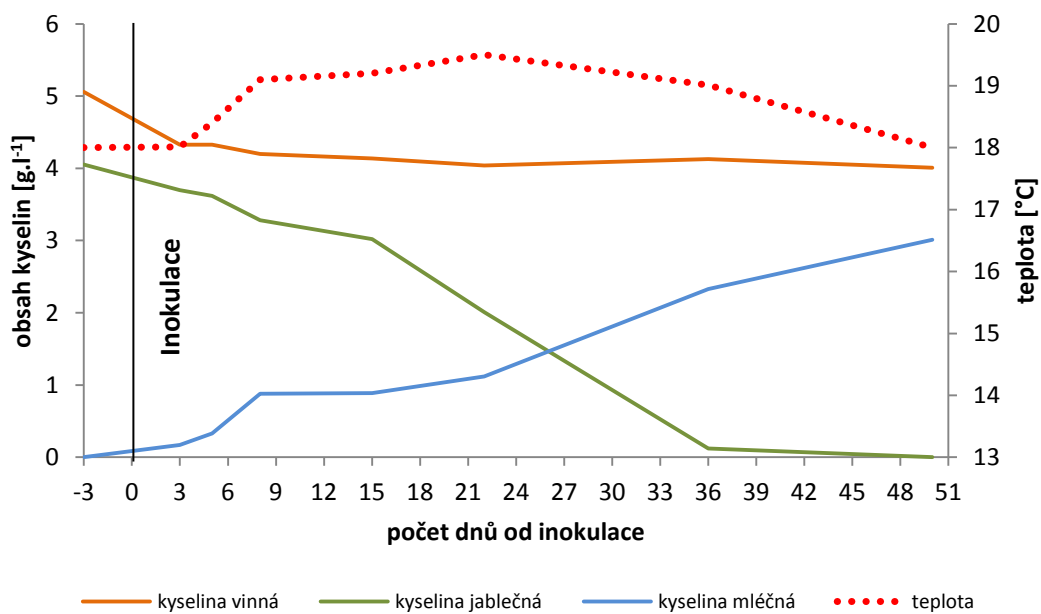
\*\* Po uplynutí 32 dnů nedošlo k odbourání veškeré kyseliny jablečné

### **Pozorování v roce 2010**

V roce 2010 byl sledován vliv použitých inokulačních preparátů Enartis ML Silver a Viniflora Oenos na odrůdách Frankovka a Cabernet Moravia. U odrůdy Frankovka došlo k nejrychlejšímu odbourání kyseliny jablečné při použití přípravku Viniflora Oenos. Po 22 dnech od inokulace došlo ke snížení obsahu kyseliny jablečné z hodnoty  $4,10 \pm 0,04$  na  $0,16 \pm 0,02$  g.l<sup>-1</sup> a vytvoření  $2,89 \pm 0,01$  g.l<sup>-1</sup> kyseliny mléčné. Konečná hodnota kyseliny mléčné ve víně byla po 50 dnech od inokulace  $3,10 \pm 0,05$  g.l<sup>-1</sup>. Odbourání kyseliny mléčné ve víně s přípravkem Enartis ML Silver trvalo o několik dnů déle. Po 36 dnech od inokulace obsahovalo  $0,12 \pm 0,03$  g.l<sup>-1</sup> kyseliny jablečné a  $2,33 \pm 0,07$  g.l<sup>-1</sup> kyseliny mléčné. Také konečné množství vytvořené kyseliny mléčné ( $3,00 \pm 0,09$  g.l<sup>-1</sup>) bylo nižší než u použití prvního preparátu (tabulka 12). Stejně jako v minulém roce, nejpomaleji probíhala jablečno-mléčná fermentace u vína se spontánním průběhem. Také zde, ani po 50 dnech od inokulace, nedošlo k úplnému odbourání kyseliny jablečné. Víno na konci pozorování obsahovalo  $2,60 \pm 0,034$  g.l<sup>-1</sup> kyseliny jablečné a  $1,10 \pm 0,01$  g.l<sup>-1</sup> kyseliny mléčné. Změny v obsahu organických kyselin u odrůdy Frankovka jsou znázorněny na obrázcích 45 až 47.

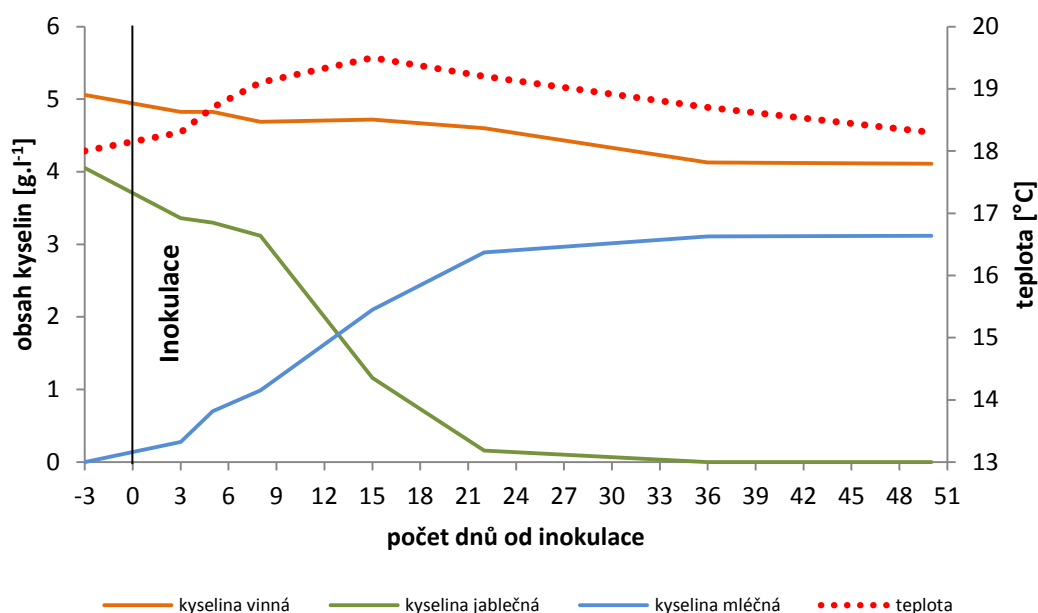


Obrázek 45: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Frankovka, bez inokulace mléčnými bakteriemi



Obrázek 46: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Frankovka, při použití preparátu Enartis ML Silver





**Obrázek 47: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Frankovka, při použití preparátu Viniflora Oenos**

**Tabulka 12: Souhrnná tabulka k hodnotám kyseliny jablečné a mléčné u vín odrůdy Frankovka v roce 2010**

	bez bakterií	Viniflora Oenos	Enartis ML Silver
obsah kyseliny jablečné před JMF	3,85 ± 0,04	3,36 ± 0,08	3,70 ± 0,13
obsah kyseliny jablečné po JMF	2,63 ± 0,03	< 0,10	< 0,10
obsah kyseliny mléčné po JMF	1,10 ± 0,01	3,12 ± 0,05	3,01 ± 0,09
poměr kyselin mléčné/jablečné*	0,29	0,93	0,81
délka JMF	50**	36	50

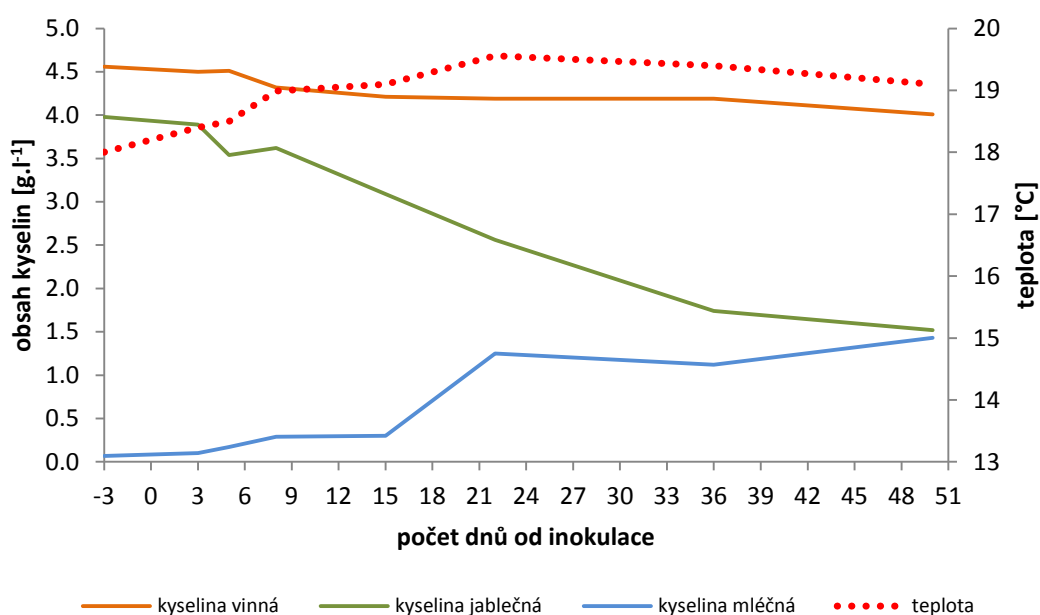
\*udává poměr kyseliny mléčné po JMF ke kyselině jablečné před JMF

\*\* Po uplynutí 50 dnů nedošlo k odbourání veškeré kyseliny jablečné

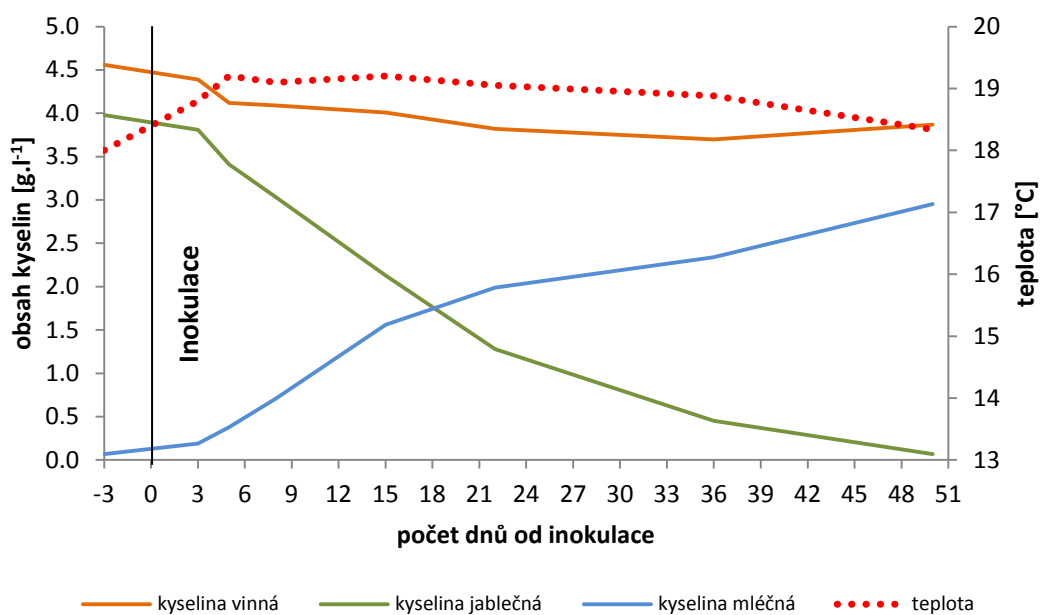
U odrůdy Cabernet Moravia byl pozorován podobný vliv inokulačního media jako u odrůdy Frankovka. Ve víně, které bylo inokulováno preparátem Viniflora Oenos, byla prakticky veškerá kyselina jablečná odbourána do 22 dnů od inokulace mléčnými bakteriemi. V tomto víně došlo také k nejvyššímu úbytku kyseliny vinné. Její koncentrace se snížila ze  $4,60 \pm 0,05 \text{ g.l}^{-1}$  na  $3,70 \pm 0,08 \text{ g.l}^{-1}$ . U preparátu Enartis ML Silver došlo k úplnému odbourání až po 50 dnech od inokulace. Po stejné době obsahovalo víno bez přídavku inokulačního preparátu ještě  $1,52 \pm 0,01 \text{ g.l}^{-1}$  kyseliny jablečné. Uvedená délka jablečno-mléčné fermentace je poměrně dlouhá v porovnání s jinými autory (COSTELLO et al. 2012, POZO-BAYÓN et al. 2005). COSTELLO et

al. (2012) sledoval vliv přidavku čtyř startovacích kultur u vína Cabernet Sauvignon a u všech přípravků došlo k odbourání kyseliny jablečné do 20 dnů.

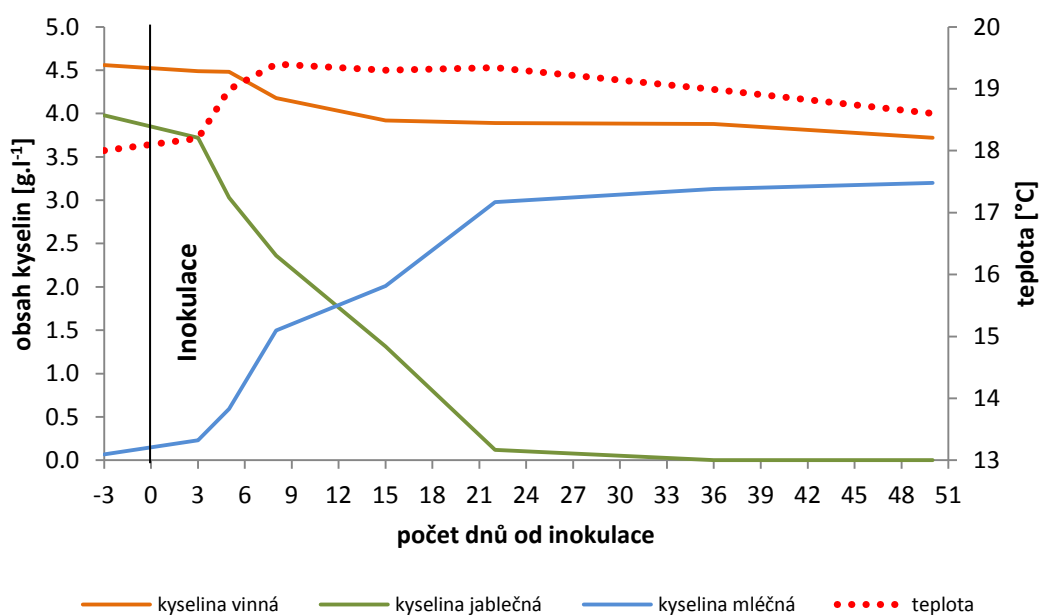
Nejvíce kyseliny mléčné obsahovalo na konci pozorování víno s přidavkem preparátu Viniflora Oenos ( $3,20 \pm 0,05 \text{ g.l}^{-1}$ ), nejméně bylo ve víně, kde proběhlo spontánní odbourávání ( $1,40 \pm 0,07 \text{ g.l}^{-1}$ ), víno s preparátem Enartis ML Silver obsahovalo  $2,90 \pm 0,08 \text{ g.l}^{-1}$  (tabulka 13). Detailní změny obsahů organických kyselin u odrůdy Cabernet Moravia znázorňují obrázky 48 až 50.



**Obrázek 48: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Cabernet Moravia, bez inokulace mléčnými bakteriemi**



Obrázek 49: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Cabernet Moravia, při použití preparátu Enartis ML Silver



Obrázek 50: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Cabernet Moravia, při použití preparátu Viniflora Oenos

**Tabulka 13: Souhrnná tabulka k hodnotám kyseliny jablečné a mléčné u vín odrůdy Cabernet Moravia v roce 2010**

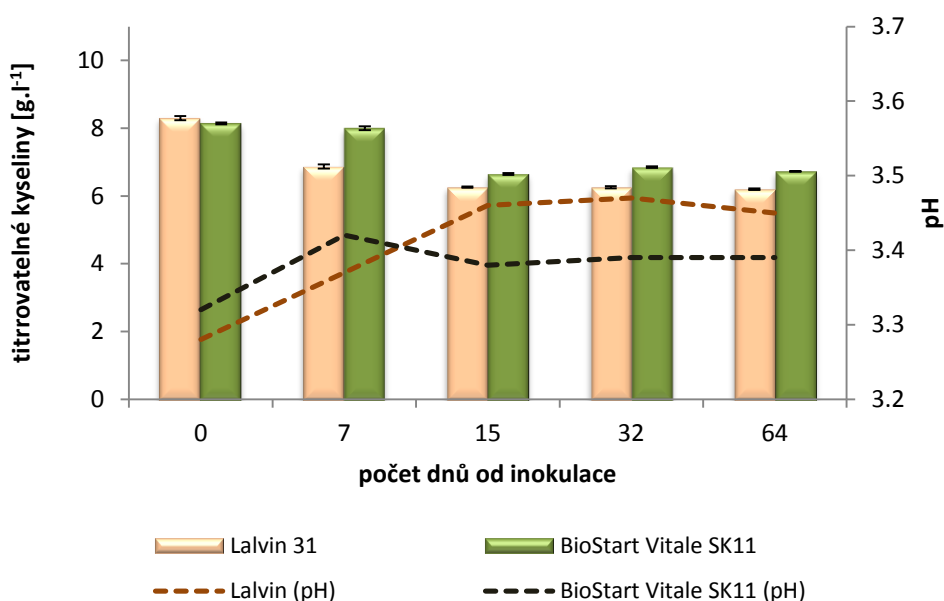
	spontánní odb.	Vinoflora Oenos	Enartis ML Silver
obsah kyseliny jablečné před JMF	3,89 ± 0,14	3,72 ± 0,09	3,81 ± 0,02
obsah kyseliny jablečné po JMF	1,52 ± 0,01	< 0,10	< 0,10
obsah kyseliny mléčné po JMF	1,40 ± 0,07	3,20 ± 0,05	2,95 ± 0,05
poměr kyselin mléčné/jablečné**	0,36	0,86	0,77
délka JMF	50*	36	50

\*udává poměr kyseliny mléčné po JMF ke kyselině jablečné před JMF

\*\* Po uplynutí 50 dnů nedošlo k odbourání veškeré kyseliny jablečné

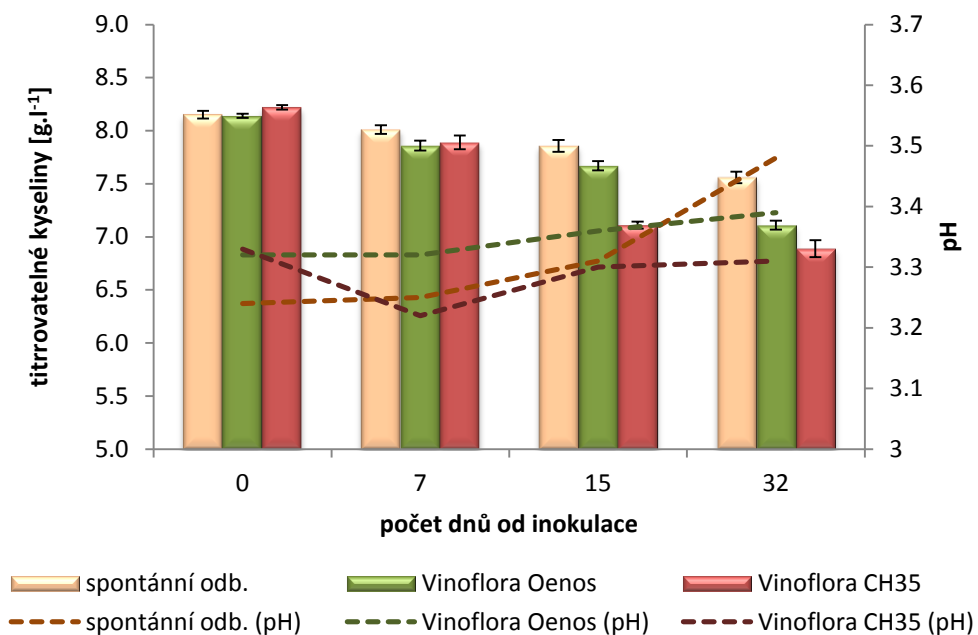
#### 4.3.2 Vliv použitého inokulačního preparátu na obsah titrovatelných kyselin

V roce 2008 byl sledován obsah titrovatelných kyselin a pH u odrůdy Frankovka s použitím dvou různých inokulačních kultur. V den inokulace byl obsah titrovatelných kyselin ve víně s preparátem Lalvin 31  $8,3 \pm 0,1 \text{ g.l}^{-1}$ , u preparátu BioStart Vitale SK11 to bylo  $8,1 \pm 0,1 \text{ g.l}^{-1}$ . I když se jednalo o stejné víno na počátku alkoholového kvašení, v každém probíhala pozvolna jablečno-mléčná fermentace ještě před přidáním inokulačních bakterií, proto je hodnota v den inokulace rozdílná. Po 64 dnech od inokulace byl vyšší obsah kyselin ve víně s preparátem BioStart Vitale SK11 ( $6,72 \pm 0,01 \text{ g.l}^{-1}$ ), s tím souvisela také nižší hodnota pH tohoto vína,  $3,40 \pm 0,01$ . U preparátu Lalvin 31 byla hodnota kyselin nižší,  $6,2 \pm 0,1 \text{ g.l}^{-1}$  a pH bylo  $3,45 \pm 0,01$ . Hodnota pH hraje klíčovou roli při určování začátku jablečno-mléčné fermentace a času potřebného pro její dokončení. Vína s hodnotou pH 3,30 a vyšší, mají tendenci být méně problematické, než vína s nižším pH (ROSI et al. 2003) Vývoj kyselin a hodnoty pH v roce 2008 je znázorněn na obrázku 51. SUN et al. (2013) porovnávali vliv šesti různých inokulačních kultur použitých při jablečno-mléčné fermentaci na obsah titrovatelných kyselin a hodnoty pH. U použití preparátu Lalvin 31 vykazovalo víno po odbourání nejmenší ztráty v obsahu titrovatelných kyselin. Z původní hodnoty  $6,3 \text{ g.l}^{-1}$  došlo ke snížení na  $5,6 \text{ g.l}^{-1}$ . Hodnota pH se zvýšila ze 4,11 na 4,21. Statisticky významné rozdíly jsou zobrazeny v tabulce 24 v Přílohách.

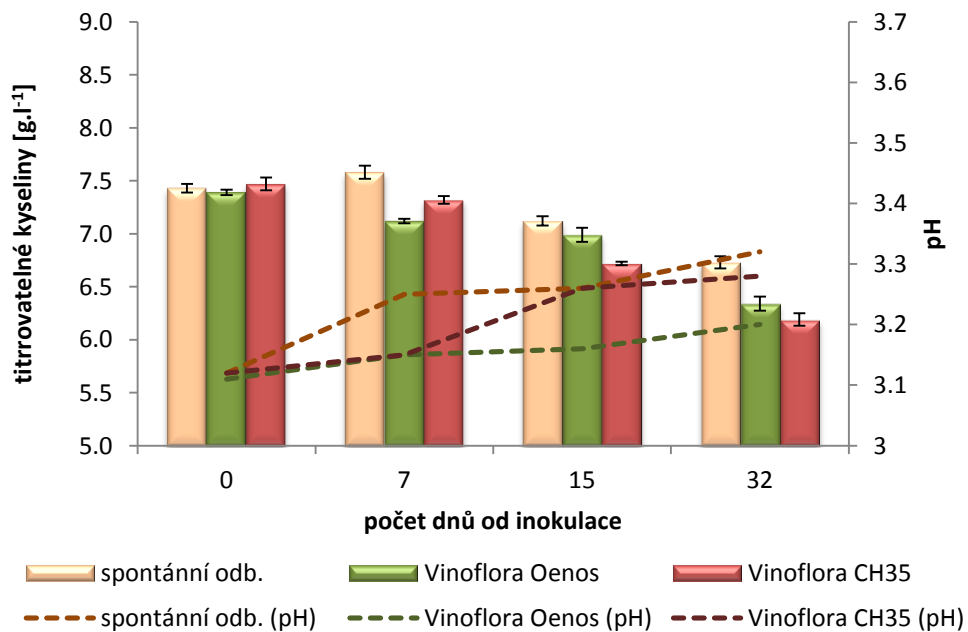


**Obrázek 51: Změny titrovatelných kyselin a pH v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vín odrůdy Frankovka v roce 2008**

Jak vyplývá z obrázku 52, vliv inokulačních preparátů na obsah titrovatelných kyselin byl v roce 2009 velmi podobný u obou sledovaných odrůd. Statisticky nejvyšší úbytek byl při použití preparátu Viniflora CH35 (tabulky 25 a 26 Přílohy). Koncentrace  $8,2 \pm 0,1 \text{ g.l}^{-1}$  u odrůdy Frankovka na počátku jablečno-mléčné fermentace se snížila po odbourání na hodnotu  $6,9 \pm 0,1 \text{ g.l}^{-1}$ , u odrůdy Merlot to bylo snížení ze  $7,5 \pm 0,1 \text{ g.l}^{-1}$  na  $6,2 \pm 0,1 \text{ g.l}^{-1}$ . Naopak nejmenší snížení se projevilo u obou odrůd po spontánním odbourávání. V případě odrůdy Frankovka se obsah snížil za 32 dnů po inokulaci o  $0,6 \text{ g.l}^{-1}$  a u odrůdy Merlot o  $0,7 \text{ g.l}^{-1}$ . I přesto, že obsah titrovatelných kyselin byl nejvyšší u vín bez přídavku bakterií mléčného kvašení, hodnota pH byla u těchto vín nejvyšší na konci jablečno-mléčné fermentace. U odrůdy Frankovka byla hodnota téměř  $3,50 \pm 0,02$  a u odrůdy Merlot  $3,32 \pm 0,01$  (obrázek 53). Nejnižší hodnoty vykazovalo víno odrůdy Frankovka s použitím preparátu Viniflora CH35, u odrůdy Merlot to bylo u preparátu Viniflora Oenos.



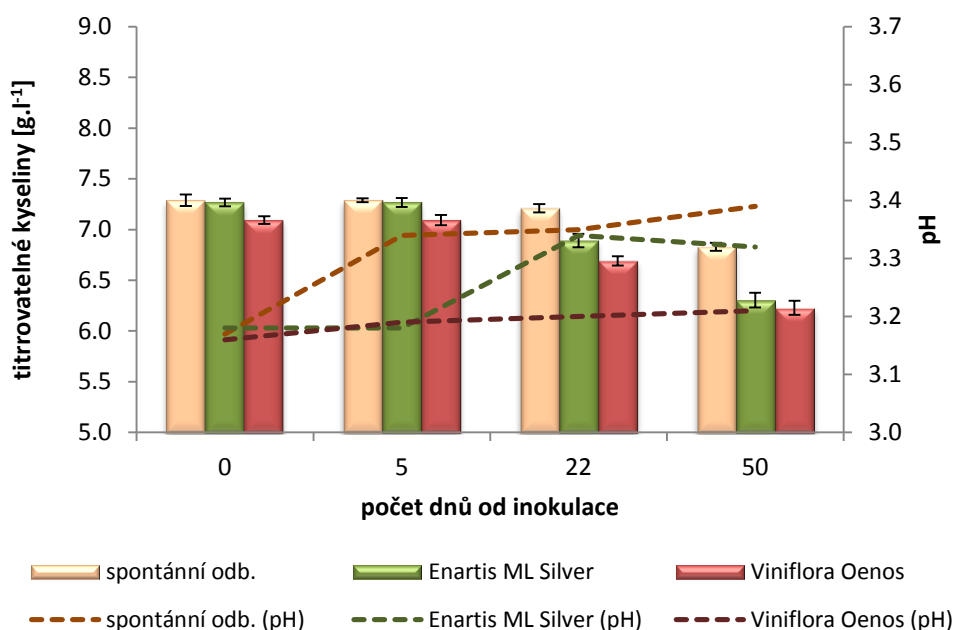
**Obrázek 52:** Změny titrovatelných kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vín odrůdy Frankovka v roce 2009, v závislosti na druhu preparátu mléčných bakterií a počtu dnů od inokulace



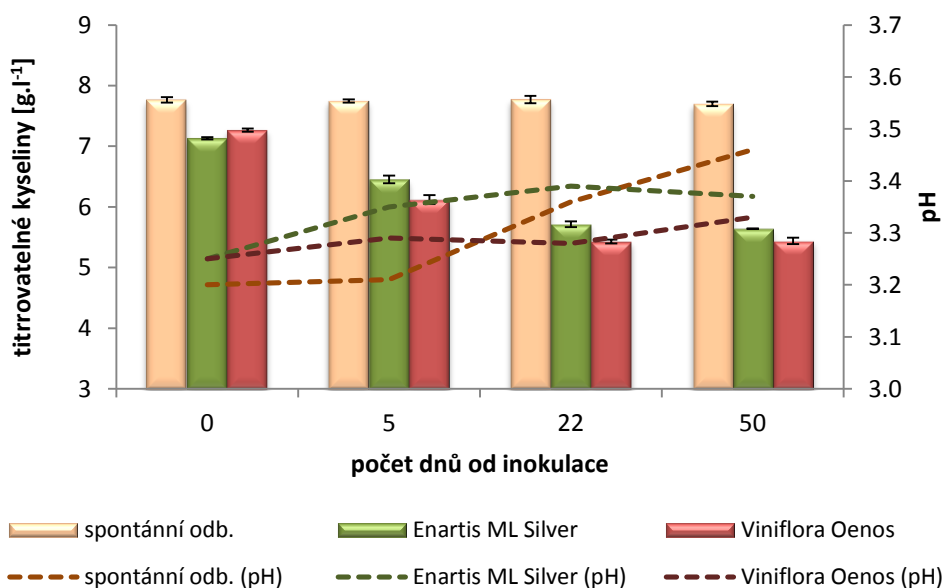
**Obrázek 53:** Změny titrovatelných kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vín odrůdy Merlot v roce 2009, v závislosti na druhu preparátu mléčných bakterií a počtu dnů od inokulace

V posledním experimentálním roce byly použity inokulační preparáty Enartis ML Silver a Viniflora Oenos u odrůd Frankovka a Cabernet Moravia. Stejně jako v minulém roce, při spontánním odbourávání docházelo k nejmenším ztrátám titrovatelných kyselin, rozdíl mezi hodnotami u použití preparátů a spontánního

odbourání byl statisticky průkazný (tabulka 27 Přílohy). U odrůdy Frankovka hodnota klesla o  $0,5 \text{ g.l}^{-1}$  u odrůdy Cabernet Moravia pouze o  $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ . Při použití inokulačních preparátů byly výsledky téměř shodné, i když větší snížení bylo pozorováno u preparátu Viniflora Oenos. Při jeho použití došlo ke snížení titrovatelných kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace o  $1 \text{ g.l}^{-1}$ , v případě preparátu Enartis ML Silver to bylo o  $0,9 \text{ g.l}^{-1}$ . U odrůdy Cabernet Moravia byly po ukončení jablečno-mléčné fermentace statisticky průkazné rozdíly mezi použitými preparáty i spontánním průběhem (tabulka 28 Přílohy). Změny v hodnotách pH potvrdily výsledky z loňského roku, kdy nejvyšší hodnoty pH opět vykazovaly vína, ve kterých proběhla jablečno-mléčná fermentace spontánně ( $3,39 \pm 0,01$  Frankovka a  $3,46 \pm 0,02$  Cabernet Moravia). V tomto roce se nejnižší hodnota pH prokázala ve vínech obou odrůd s přidavkem preparátu Viniflora Oenos. Víno z odrůdy Frankovka mělo výslednou hodnotu pH  $3,21 \pm 0,01$  a z odrůdy Cabernet Moravia  $3,33 \pm 0,01$ . Změny v obsahu titrovatelných kyselin a hodnotě pH u odrůd Frankovka a Cabernet Moravia jsou znázorněny na obrázcích 54 a 55. DROŽDŽ et al. (2014) sledovali ve své práci vliv přidavku startovací kultury Viniflora Oenos na obsah titrovatelných kyselin u třech vín. Ve všech případech došlo po jablečno-mléčné fermentaci ke snížení obsahu kyselin. Nejvýrazněji u odrůdy Marechal Foch, kde hodnota klesla o  $2,7 \text{ g.l}^{-1}$ . U vína z odrůdy Frotenac to bylo pouze o  $0,3 \text{ g.l}^{-1}$  a u odrůdy Seyval Blanc o  $1,1 \text{ g.l}^{-1}$ . Sledovali také změny v hodnotách pH, kdy u odrůdy Marechal Foch došlo k navýšení hodnoty z 3,37 na 3,64, u odrůdy z 3,07 na 3,27 a u odrůdy Seyval Blanc pozorovali nejvyšší navýšení z hodnoty 2,43 na 3,28. Vliv použité startovací kultury na snížení obsahu titrovatelných kyselin a ovlivnění hodnoty pH ve svých výsledcích potvrzuje množství vědeckých prací (BAUER, DICKS, 2004; CAÑASA et al. 2013; HERJAVEC et al. 2001, LERM et al. 2010)



Obrázek 54: Změny titrovatelných kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vín odrůdy Frankovka, při použití inokulačních preparátů Enartis ML Silver a Viniflora Oenos



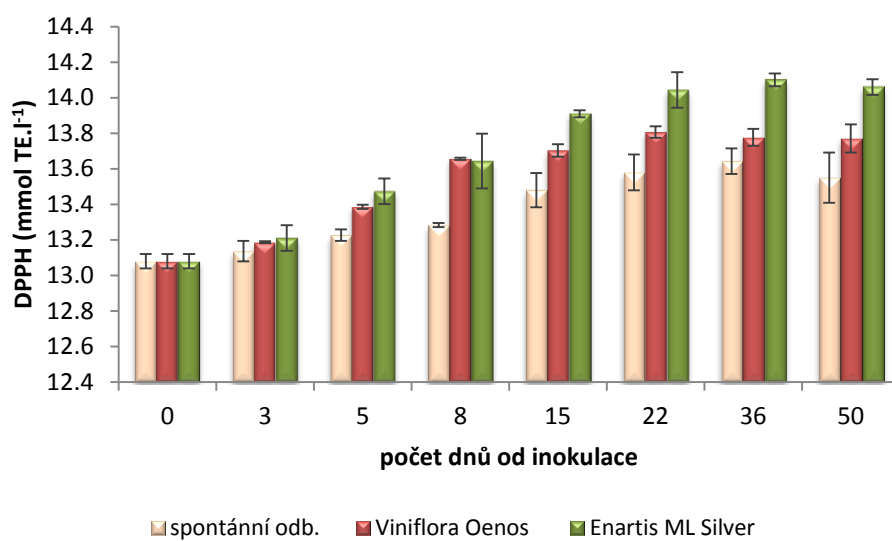
Obrázek 55: Změny titrovatelných kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vín odrůdy Cabernet Moravia, při použití inokulačních preparátů Enartis ML Silver a Viniflora Oenos

#### 4.3.3 Vliv použitého inokulačního preparátu na obsah antioxidační kapacity

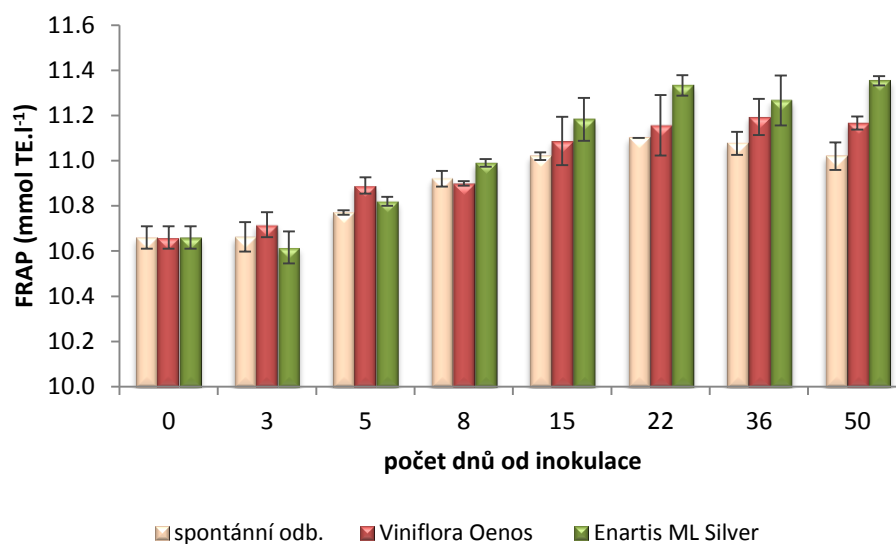
Antioxidační kapacita ve vínech byla sledována v roce 2010 u vín odrůdy Frankovka a Cabernet Moravia. Ve všech případech byl prokázán nárůst hodnoty antioxidační kapacity v průběhu jablečno-mléčné fermentace. Důvodem by mohla být zvýšená hydrolytická aktivita bakteriálních enzymů. Rozkladem esterů dochází k jejich



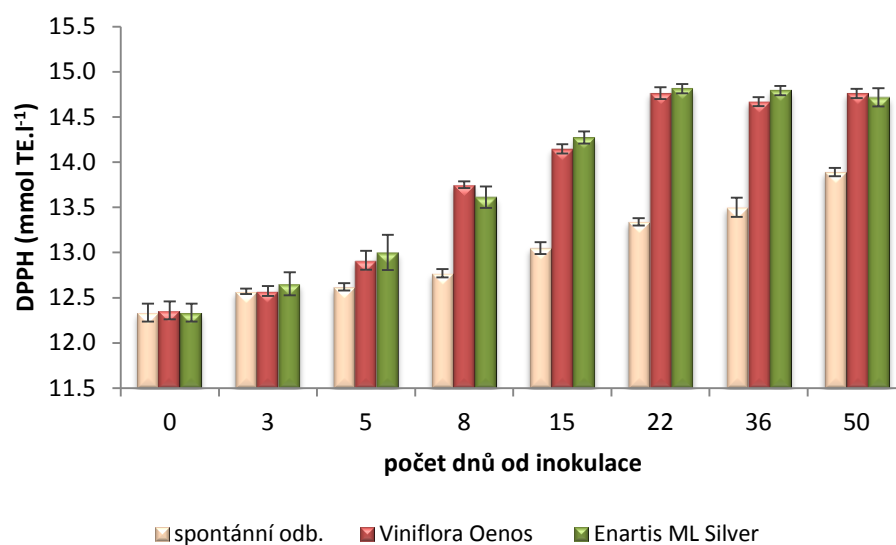
uvolnění do kyselé formy, která má vyšší antioxidační aktivitu. Podporována je také enzymatická hydrolýza proteinů a volné aminokyseliny mohou mít synergický účinek s antioxidanty obsaženými ve víně (CZASPSKI, MIKOLAJCZYK, 2007). K nejvýraznějšímu navyšování docházelo vždy v prvních 15 dnech od inokulace mléčnými bakteriemi. Antioxidační kapacita stanovená metodou DPPH se zvýšila u odrůdy Frankovka o  $0,58 \pm 0,05$  mmol TE.l<sup>-1</sup> u odrůdy Cabernet Moravia o  $1,49 \pm 0,06$  mmol TE.l<sup>-1</sup>, metodou FRAP o  $0,47 \pm 0,07$  mmol TE.l<sup>-1</sup> u vína odrůdy Frankovka a u Cabernet Moravia o  $0,46 \pm 0,07$  mmol TE.l<sup>-1</sup>. V dalších dnech docházelo k velmi malým změnám obsahu antioxidačních látek. Na tvorbu antioxidačních látek u odrůdy Frankovka se jako vhodnější preparát osvědčil Enartis ML Silver. U odrůdy Cabernet Moravia byly pozorovány podobné hodnoty u obou preparátů, rozdíly v hodnotách nebyly statisticky průkazné ve všech případech (tabulky 29 až 32 přílohy). Nejvyšší hodnota,  $14,8 \pm 0,05$  mmol TE.l<sup>-1</sup>, byla naměřena metodou DPPH u odrůdy Cabernet Moravia s použitím přípravku Enartis ML Silver ve 22 dnu od inokulace. Nejmenší množství antioxidačních látek se vytvářelo při spontánním odbourávání u obou odrůd. U odrůdy Cabernet Moravia se tato závislost projevila výrazněji. Obrázky 56 až 59 znázorňují podrobné hodnoty antioxidační kapacity v průběhu jablečno-mléčné fermentace. Vlivem inokulačních kultur na antioxidační kapacitu vín se zabývali také DROŽDŽ et al. (2014). Nejvyšší navýšení sledovali u vína z odrůdy Marechal Foch, které před odbouráváním obsahovalo 12,44 a po odbourání 45 mmol TE.l<sup>-1</sup>. U Odrůdy Frontenac zjistili navýšení z 11,44 na 31,48 mmol TE.l<sup>-1</sup> a u odrůdy Seyval Blanc z hodnoty 2,16 na 3,48 mmol TE.l<sup>-1</sup>.



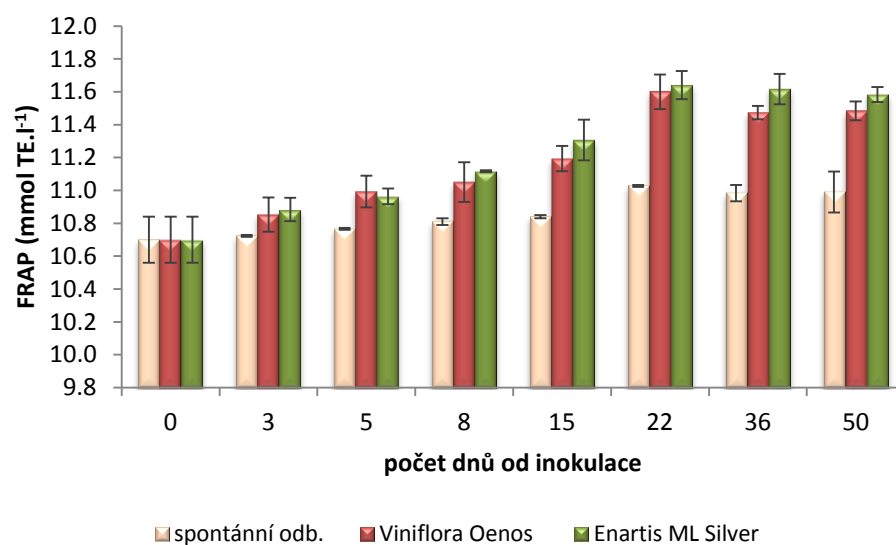
**Obrázek 56:** Změny antioxidační kapacity v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vín odrůdy Frankovka, měřené metodou DPPH



**Obrázek 57:** Změny antioxidační kapacity v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vín odrůdy Frankovka, měřené metodou FRAP



**Obrázek 58:** Změny antioxidační kapacity v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vín odrůdy Cabernet Moravia, měřené metodou DPPH



**Obrázek 59:** Změny antioxidační kapacity v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vín odrůdy Cabernet Moravia, měřené metodou FRAP

#### 4.3.4 Vliv použitého inokulačního preparátu na obsah alkoholu a vybraných karbonylových sloučenin

Pro lepší porozumění vlivu inokulačních kultur na obsah karbonylových sloučenin ve víně v průběhu jablečno-mléčné fermentace byli vybráni následující zástupci: diacetyl, 2,3-pentandion a acetoin. Jejich obsah byl stanoven vždy před, a po ukončení jablečno-mléčné fermentace za použití čtyř vybraných inokulačních preparátů

a při spontánním průběhu odbourávání. V roce 2008 bylo měření provedeno u odrůdy Frankovka s přídatkem preparátu Lalvin 31. Víno před jablečno-mléčnou fermentací obsahovalo  $1,6 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$  diacetylu,  $0,1 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  2,3-pentandionu a méně než  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  acetoinu. Po dokončení odbourávání se obsah diacetylu navýšil na hodnotu  $2,4 \pm 0,3 \text{ mg.l}^{-1}$  a koncentrace 2,3-pentandionu se snížila pod detekovatelnou hranici  $0,1 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ . Velký nárůst byl však pozorován u acetoinu, jehož hodnota na konci odbourávání byla  $19,2 \pm 1,3 \text{ mg.l}^{-1}$ . K podobným závěrům dospěli také SUN et al. (2013), který sledoval vliv preparátu Lalvin 31 na obsah acetoinu a diacetylu ve víně. Po proběhnutí jablečno-mléčné fermentace zjistil obsah acetoinu  $25,4 \text{ mg.l}^{-1}$  a diacetylu  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ . Ještě vyšší hodnotu acetoinu obsahovalo víno s přípravkem BioStar Vitale SK11,  $20,2 \pm 1,3 \text{ mg.l}^{-1}$  což byla nejvyšší hodnota ze všech sledovaných vzorků. Acetoin vzniká rozkladem diacetylu činností mléčných bakterií (MARTINEAU et al., 1995). To by vysvětlovalo relativně nízké hodnoty diacetylu u vín s vyšším obsahem acetoinu. U stejného preparátu byla sledována nejvyšší hodnota 2,3-pentandionu  $1,1 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ . V roce 2009 se tvořilo největší množství diacetylu ve vzorcích vína, které byly ponechány spontánnímu průběhu odbourávání. Víno odrůdy Frankovka v tomto případě obsahovalo množství  $7,3 \pm 0,9 \text{ g.l}^{-1}$  a Merlot  $10,8 \pm 1,5 \text{ g.l}^{-1}$ . Vyšší množství diacetylu a acetoinu je produkováno při déle trvající jablečno-mléčné fermentaci (BARTOWSKY a HENSCHKE, 2004), což potvrzují i výsledky této práce, u přípravků Lalvin 31, BioStar Vitale SK11 a u spontánního průběhu trvalo odbourávání delší dobu. S tvorbou diacetylu souviselo snížení obsahu kyseliny citronové, jejíž obsah klesl u spontánního průběhu u vína odrůdy Merlot o 43 % z hodnoty  $312 \pm 28 \text{ mg.l}^{-1}$  na  $134 \pm 9 \text{ mg.l}^{-1}$ . Diacetyl je při nízkých úrovních (do  $5 \text{ mg.l}^{-1}$ ) vnímán jako pozitivní, dodává vínu komplexnost a příjemné aroma. Ve vyšších koncentracích však vytváří intenzivní máslovou nebo karamelovou příchut', což je vnímáno většinou negativně (MORENO-ARRIBAS, 2009). Nejméně diacetylu bylo ve vínech s přípravkem Viniflora CH35,  $0,7 \pm 0,1 \text{ g.l}^{-1}$  u odrůdy Frankovka a  $1,8 \pm 0,2 \text{ g.l}^{-1}$  u odrůdy Merlot, tyto vína také obsahovaly největší množství 2,3-pentandionu, což potvrzuje negativní korelaci mezi obsahem diacetylu a 2,3-pentandionu, kterou uvádí MARTINEAU et al. (1995). Obsah acetoinu byl u všech vzorků v roce 2009 pod hranicí detekce, s výjimkou vína odrůdy Frankovka, kde proběhlo odbourávání bez přídatku mléčných bakterií. Tento vzorek obsahoval množství acetoinu v koncentraci  $1,3 \pm 0,9 \text{ mg.l}^{-1}$ . V roce 2010 byla na obsah

karbonylových sloučenin analyzována pouze odrůda Cabernet Moravia s inokulací preparátem Viniflora Oenos. Po ukončení odbourávání víno obsahovalo vyšší množství diacetylu ( $9,4 \pm 1,3 \text{ mg.l}^{-1}$ ), k mírnému navýšení došlo také v případě 2,3-pentandionu a acetoinu ( $0,2 \pm 0,1$  a  $1,3 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Naměřené hodnoty výše zmíněných sloučenin jsou zobrazeny v tabulce 14. Nejvyšší snížení obsahu kyseliny citronové bylo pozorováno u odrůdy Frankovka v roce 2008. U preparátu Lalvin 31 došlo ke snížení obsahu kyseliny citronové o 37 % z hodnoty  $287 \pm 23 \text{ mg.l}^{-1}$  na  $106 \pm 34 \text{ mg.l}^{-1}$ . U preparátu BioStar Vitale SK11 to bylo o 44% z hodnoty  $296 \pm 17 \text{ mg.l}^{-1}$  na  $131 \pm 22 \text{ mg.l}^{-1}$ .

**Tabulka 14: Změny v obsahu vybraných karbonylových sloučenin a kyseliny citronové ve víně v závislosti na druhu použitého preparátu mléčných bakterií**

odrůda	rok	termín	použitý preparát	diacetyl [mg.l <sup>-1</sup> ]	2,3- pentandion [mg.l <sup>-1</sup> ]	acetoin [mg.l <sup>-1</sup> ]	kyselina citronová [mg.l <sup>-1</sup> ]
<b>Frankovka</b>	2008	před JMF		1,6 ± 0,2	0,1 ± 0,1	< 1,0	287 ± 23
		po JMF	Lalvin 31	2,4 ± 0,3	< 0,1	19,2 ± 1,3	106 ± 34
		před JMF		0,1 ± 0,1	<b>1,1</b> ± 0,1	3,1 ± 0,1	296 ± 17
		po JMF	BioStar Vitale SK11	2,9 ± 0,4	0,3 ± 0,1	<b>20,2</b> ± 1,3	131 ± 22
	2009	před JMF		1,6 ± 0,2	< 0,1	< 1,0	274 ± 51
		po JMF	spontánní odb.	7,3 ± 0,9	< 0,1	1,3 ± 0,1	106 ± 49
		po JMF	Viniflora Oenos	1,5 ± 0,2	< 0,1	< 1,0	155 ± 12
		po JMF	Viniflora CH35	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1	< 1,0	201 ± 23
<b>Merlot</b>	2009	před JMF		2,4 ± 0,3	0,1 ± 0,1	< 1,0	312 ± 28
		po JMF	spontánní odb.	<b>10,8</b> ± 1,5	0,1 ± 0,1	< 1,0	134 ± 9
		po JMF	Viniflora Oenos	2,3 ± 0,3	0,4 ± 0,1	< 1,0	172 ± 15
		po JMF	Viniflora CH35	1,8 ± 0,2	0,9 ± 0,1	< 1,0	230 ± 31
<b>Cabernet Moravia</b>	2010	před JMF		6,1 ± 0,8	< 0,1	< 1,0	198 ± 23
		po JMF	Viniflora Oenos	9,4 ± 1,3	0,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	123 ± 31

Obsah alkoholu ve víně se ve většině případů následkem jablečno-mléčné fermentace snižuje. Jak lze vidět z tabulky 15, tento trend prokazují také výsledky této práce. Vliv přídavku inokulačních preparátů potvrdil spíše negativní vliv na obsah alkoholu ve víně. Nejmenší ztráty byly pozorovány ve všech variantách u vín bez přídavku bakterií, statisticky průkazné rozdíly však byly sledovány pouze u vína odrůdy Frankovka (tabulky 48 a 49 Přílohy). Naopak nejvyšší ztráty byly zjištěny u vína odrůdy Frankovka s preparátem Viniflora CH35, ve kterém se po ukončení jablečno-

mléčné fermentace snížil obsah alkoholu o  $0,38 \pm 0,04$  % obj. v roce 2009. Rozdíly mezi preparáty Viniflora CH35 a Viniflora Oenos nebyly statisticky významné (tabulka 48 Přílohy). Nejmenší snižování obsahu alkoholu v průběhu jablečno-mléčné fermentace bylo pozorováno u vína odrůdy Merlot. Zde byl zjištěn minimální pokles při odbourávání s přidavkem preparátů a dokonce nulová ztráta při spontánním odbourávání, statisticky významný pokles byl sledován pouze u vín s přidavkem čistých kultur mléčných bakterií (tabulka 50 Přílohy). U vína odrůdy Cabernet Moravia docházelo k určitému snížení obsahu alkoholu, ovšem ne tak výraznému jako u vína odrůdy Frankovka. Rozdíl v obsahu alkoholu před jablečno-mléčnou fermentací a po spontánním odbourání u vína odrůdy Cabernet Moravia nebyl statisticky průkazný (tabulka 51 Přílohy).

*Tabulka 15: Změny obsahu alkoholu ve víně vlivem jablečno-mléčné fermentace*

odrůda	rok	termín	použitý preparát	Obsah alkoholu [% obj.]
Frankovka	2009	před JMF		$12,88 \pm 0,02$
		po ukončení JMF	spontánní odb.	$12,66 \pm 0,02$
		po JMF	Viniflora Oenos	$12,51 \pm 0,01$
		po ukončení JMF	Viniflora CH35	$12,50 \pm 0,04$
	2010	před JMF		$12,81 \pm 0,05$
		po ukončení JMF	spontánní odb.	$12,69 \pm 0,05$
		po ukončení JMF	Viniflora Oenos	$12,55 \pm 0,04$
		po ukončení JMF	Enartis ML Silver	$12,45 \pm 0,05$
Merlot	2009	před JMF		$12,99 \pm 0,04$
		po ukončení JMF	spontánní odb.	$12,96 \pm 0,02$
		po ukončení JMF	Viniflora Oenos	$12,88 \pm 0,05$
		po ukončení JMF	Viniflora CH35	$12,96 \pm 0,05$
Cabernet Moravia	2010	před JMF		$12,63 \pm 0,03$
		po ukončení JMF	spontánní odb.	$12,58 \pm 0,06$
		po ukončení JMF	Viniflora Oenos	$12,43 \pm 0,04$
		po ukončení JMF	Enartis ML Silver	$12,53 \pm 0,03$

#### 4.3.5 Vliv použitého inokulačního preparátu na barevné změny ve víně

Při sledování barevných změn byly měřeny všechny sledované vzorky v průběhu experimentu. K vyjádření jasu a barevnosti byly stanoveny souřadnice v chromatickém diagramu  $L^*a^*b^*$ . Pro porovnání velikosti barevného rozdílu mezi víny před a po ukončení jablečno-mléčné fermentace byla vypočítána hodnota  $\Delta E$ , která udává velikost

rozdílů mezi barevnými změnami. Výsledky měření barevnosti vín jsou znázorněny v tabulkách 16 a 17. U odrůdy Frankovka došlo ve všech 3 experimentálních letech ke snížení světlosti vína vyjádřené hodnotou  $L^*$  po proběhnutí jablečno-mléčné fermentace. Tento trend byl pozorován také u vína odrůdy Merlot, odrůda Cabernet Moravia vykazovala po proběhnutí jablečno-mléčné fermentace zvýšení hodnoty světlosti.

Změny v hodnotě  $a^*$ , která udává červenozelelou osu, nebyly u všech vzorků jednoznačné. V roce 2008 a 2009 docházelo u vína odrůdy Frankovka spíše k poklesu této hodnoty po jablečno-mléčné fermentaci, v roce 2010 byl naopak zaznamenán nárůst. U odrůd Merlot a Cabernet Moravia, došlo po jablečno-mléčné fermentace také ke snížení hodnot  $a^*$ , tedy poklesu červeného tónu vína. Nejvyšší snížení bylo sledováno u odrůdy Cabernet Moravia při použití preparátu Viniflora Oenos, hodnota na počátku jablečno-mléčné fermentace  $47,8 \pm 1,1$  klesla na hodnotu  $40,5 \pm 2,2$ . Také u odrůdy Merlot a Frankovka v roce 2009 byla tato hodnota nejnižší právě při použití preparátu Viniflora Oenos. Při spontánním odbourávání došlo k nejmenším ztrátám červených tónů u všech sledovaných vín. Snižování červených tónů u odrůd Merlot a Rulandské modré v průběhu jablečno-mléčné fermentace uvádí ve své práci také BURNS a OSBORNE (2013). Tvrdí, že k degradaci červené barvy docházelo u všech vín bez ohledu na použitý preparát startovacích kultur mléčných bakterií. Změny v červené barvě vína následkem jablečno-mléčné fermentace potvrzují i další vědecké práce u odrůdy Shiraz (ABRAHAMSE, BARTOWSKY 2012) i u odrůdy Cabernet Sauvignon (COSTELLO et al., 2012). BARTWOSKI et al. (2011) uvádí, že některé kmeny *O.oeni* vykazují vyšší úroveň  $\beta$ -glukosidázové aktivity, která může ovlivňovat barvu vína tím, že hydrolyzuje glykosidické vazby antokyanů.

Stoupající trend hodnoty  $b^*$  po jablečno-mléčné fermentaci, charakterizující snížení podílu modrých tónů tedy především antokyanových barviv byl pozorován u odrůd Merlot, Cabernet Moravia a Frankovka v roce 2010. U odrůd Frankovka v roce 2010 a Cabernet Moravia došlo k nejvyššímu nárůstu hodnoty  $b^*$  u spontánního průběhu odbourávání. U odrůdy Merlot došlo k nejvyšším ztrátám modrých tónů při použití preparátu Viniflora CH35. BURNS a OSBORNE (2013) sledovali vliv mléčných bakterií na degradaci barviv v červených vínech v průběhu jablečno-mléčné fermentace. Výsledky jeho práce potvrzují, že vína, která byla odbouraná, měla

prokazatelně nižší barvu než vína neodbouraná. Jako hlavní důvod uvádí rozklad acetaldehydu mléčnými bakteriemi. Při doplnění acetaldehydu v průběhu jablečno-mléčné fermentace měla vína vyšší barvu. Pro minimalizaci ztrát barvy u červených vín v průběhu odbourávání doporučuje volbu kvasinek, které produkují vyšší množství acetaldehydu a kmeny mléčných bakterií, které rozkládají acetaldehyd méně. Statisticky významné rozdíly mezi hodnotami  $L^*a^*b^*$  jsou znázorněny v tabulkách 33 až 47 v Přílohách.

*Tabulka 16: Změny v barevných hodnotách  $L^*a^*b^*$  u červených vín vlivem jablečno-mléčné fermentace*

odrůda	rok	termín	použitý preparát	$L^*$	$a^*$	$b^*$
Frankovka	2008	Před JMF		50,1 ± 0,9	35,2 ± 1,9	18,7 ± 2,6
		po ukončení JMF	Lalvin 31	49,1 ± 1,0	39,7 ± 2,9	13,5 ± 1,8
		před JMF		49,9 ± 2,4	57,6 ± 1,5	6,8 ± 0,7
		po ukončení JMF	BioStar Vitale SK 11	49,8 ± 2,7	54,5 ± 0,6	4,7 ± 1,6
	2009	před JMF		56,9 ± 0,6	37,5 ± 0,4	18,8 ± 0,8
		po ukončení JMF	spontánní odb.	53,3 ± 1,8	35,8 ± 2,4	18,3 ± 1,1
		po ukončení JMF	Viniflora CH35	51,7 ± 1,1	35,8 ± 2,8	17,5 ± 1,3
		po ukončení JMF	Viniflora Oenos	51,8 ± 2,3	35,5 ± 0,9	17,9 ± 2,8
	2010	před JMF		63,2 ± 0,5	43,0 ± 0,4	2,6 ± 2,7
		po ukončení JMF	spontánní odb.	58,7 ± 1,7	48,0 ± 2,4	5,2 ± 1,5
po ukončení JMF		Enartis ML Silver	60,6 ± 1,3	46,1 ± 1,1	3,3 ± 2,1	
po ukončení JMF		Viniflora Oenos	60,3 ± 2,5	46,0 ± 0,9	3,5 ± 2,8	
Merlot	2009	před JMF		30,5 ± 2,3	38,8 ± 0,2	14,1 ± 2,0
		po ukončení JMF	spontánní odb.	25,5 ± 2,8	37,2 ± 0,9	18,4 ± 0,8
		po ukončení JMF	Viniflora CH35	22,7 ± 0,7	36,8 ± 1,7	18,9 ± 2,2
		po ukončení JMF	Viniflora Oenos	28,1 ± 1,9	34,0 ± 2,7	13,2 ± 1,8
Cabernet Moravia	2010	před JMF		35,1 ± 1,4	47,8 ± 1,1	4,6 ± 0,9
		po ukončení JMF	spontánní odb.	35,3 ± 1,4	47,2 ± 0,9	6,2 ± 2,0
		po ukončení JMF	Enartis ML Silver	38,9 ± 2,8	41,9 ± 0,2	5,3 ± 0,9
		po ukončení JMF	Viniflora Oenos	39,3 ± 1,9	40,5 ± 2,2	5,7 ± 2,3

Míra velikosti barevného rozdílu definovaná odchylkou delta E ( $\Delta E$ ) u jednotlivých vín a přípravků je znázorněná v tabulce 6. VIK (1996) uvádí, že hodnota vyšší než 3 jednotky vyjadřuje barevný rozdíl, který lze vizuálně vnímat lidským okem. S výjimkou spontánně odbouraného vína odrůdy Cabernet Moravia, přesáhly všechny varianty tuto hodnotu. Nejvyšší míra barevného rozdílu byla stanovena u odrůdy Merlot, při použití preparátu Viniflora CH35 ( $\Delta E = 9,44$ ). U vína odrůdy Frankovka v roce 2009 tento preparát také způsobil nejvyšší barevný rozdíl od vína před jablečno-



mléčnou fermentací ( $\Delta E = 5,67$ ). Ovšem nejvyšší hodnota  $\Delta E$  u vína odrůdy Frankovka byla v roce 2010 u spontánně odbouraného vína (7,25). U vína odrůdy Cabernet Moravia bylo nejvíce barevně odlišné víno s preparátem Viniflora Oenos ( $\Delta E = 8,53$ ). Na základě těchto hodnot by se tedy dalo konstatovat, že působením mléčných bakterií dochází ke změně barevného profilu červených vín. Nebyl však potvrzen jednoznačný vliv konkrétního preparátu, protože u jednotlivých odrůd byly sledovány odlišné změny při použití stejných preparátů.

*Tabulka 17: Hodnoty barevných změn vyjádřených pomocí  $\Delta E$  u vín s použitými inokulačními preparáty mléčných bakterií*

<b>odrůda</b>	<b>rok</b>	<b>použitý preparát</b>	<b><math>\Delta E</math></b>
<b>Frankovka</b>	2008	Lalvin 31	6,94
		BioStar Vitale SK 11	3,76
	2009	spontánní odb.	4,03
		Viniflora CH35	5,67
		Viniflora Oenos	5,59
	2010	spontánní odb.	7,25
Enartis ML Silver		4,10	
Viniflora Oenos		4,27	
<b>Merlot</b>	2009	spontánní odb.	6,81
		Viniflora CH35	9,44
		Viniflora Oenos	5,42
<b>Cabernet Moravia</b>	2010	spontánní odb.	1,77
		Enartis ML Silver	7,12
		Viniflora Oenos	8,53

## 5. ZÁVĚR

Disertační práce se zabývala sledováním vlivu agrotechnických zásahů regulujících listovou plochu na látkové složení hroznů. V další části je zaměřena na porovnání vlivu různých inokulačních kultur na změny ve vínech v průběhu jablečno-mléčné fermentace. Na základě poznatků v literárním přehledu byly v cíli práce formulovány čtyři vědecké hypotézy.

V první části byly vytvořeny tři experimentální varianty, vždy s patnácti keři révy vinné. Na těchto pokusných rostlinách byl sledován vliv velikosti listové plochy na obsah titrovatelných kyselin, rozpustné sušiny, hodnoty pH a vybraných organických kyselin

v hroznech během tříletého období (2008, 2009 a 2010). Sledování bylo provedeno na odrůdách Rulandské šedé, Sauvignon a Ryzlink rýnský. Pro stanovení celkové listové plochy keře révy vinné byla změřena průměrná velikost listů jednotlivých odrůd. Největší listy byly na odrůdě Ryzlink rýnský, jejich průměrná plocha byla  $(208,9 \pm 27,1) \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ , odrůda Rulandské šedé měla listy u průměrné ploše  $(191,8 \pm 21,6) \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$  a u odrůdy Sauvignon to byla hodnota  $(133,2 \pm 24,8) \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ . Na základě těchto dat byla vypočítána průměrná velikost listové plochy na 1 keři u jednotlivých variant. Keře v první variantě byly ponechány bez ošetření listové plochy, ta tedy vykazovala nejvyšší hodnoty na jednom keři (Ryzlink rýnský  $4,57 \pm 0,21 \text{ m}^2$ , Sauvignon  $2,85 \pm 0,07 \text{ m}^2$ , Rulandské šedé  $3,21 \pm 0,31 \text{ m}^2$ ). U druhé varianty bylo provedeno ošetření se běžným zakrácením letorostů, keře tedy měly následující průměrné hodnoty listové plochy: Ryzlink rýnský  $2,77 \pm 0,12 \text{ m}^2$ , Sauvignon  $1,73 \pm 0,15 \text{ m}^2$ , Rulandské šedé  $2,04 \pm 0,18 \text{ m}^2$ ). U třetí varianty bylo provedeno nejintenzivnější ošetření listové plochy, takže keře vykazovaly nejnižší listovou plochu (Ryzlink rýnský  $1,32 \pm 0,08 \text{ m}^2$ , Sauvignon  $1,08 \pm 0,08 \text{ m}^2$ , Rulandské šedé  $1,11 \pm 0,13 \text{ m}^2$ ).

Nejvyšší obsahy rozpustné sušiny vykazovaly hrozny odrůdy Sauvignon, dále Rulandské šedé a nejnižší hodnoty byly zjištěny u odrůdy Ryzlink rýnský. Nejvyšší koncentrace byly pozorovány vždy na keřích s největší listovou plochou, statisticky průkazný rozdíl mezi variantami byl však prokázán pouze u odrůdy Ryzlink rýnský v roce 2009. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo u odrůdy Sauvignon v roce 2009

( $24,3 \pm 0,4$  °Bx u druhé varianty a  $24,1 \pm 0,4$  °Bx u první varianty). Statisticky významná pozitivní korelace mezi listovou plochou a obsahem rozpustné sušiny v hroznech však byla potvrzena pouze u odrůdy Rulandské šedé ( $r = 0,613$ ). Tato odrůda vykazovala největší citlivost na velikost listové plochy ve schopnosti tvořit cukry v hroznech, naopak nejmenší měla odrůda Sauvignon, u které především v roce 2010 byly rozdíly mezi variantami ošetření minimální. Nepotvrzená korelace u odrůdy Sauvignon a Ryzlink rýnský by mohla být způsobena příliš velkým vlivem jednotlivých ročníků na obsah rozpustné sušiny v hroznech. I přesto, že průměrné hodnoty rozpustné sušiny byly vždy nejvyšší na keřích s největší listovou plochou, nebyly tyto rozdíly ve většině případů statisticky průkazné. To znamená, že experimentálně nebyla prokázána platnost hypotézy, že větší listová plocha na keři révy vinné bude mít za následek vyšší hodnoty rozpustné sušiny v hroznech.

U obsahu titrovatelných kyselin byl sledován obdobný trend, jako u rozpustné sušiny. Nejvyšší množství kyselin vytvářely hrozny na keřích s největší listovou plochou (průměrné hodnoty u odrůdy Sauvignon  $10,9 \pm 5,5$  g.l<sup>-1</sup>, Ryzlink rýnský  $13,2 \pm 3,5$  g.l<sup>-1</sup>), ale ne ve všech případech. Nejvyšší průměrná hodnota u odrůdy Rulandské šedé byla zjištěna u druhé varianty ( $10,4 \pm 2,4$  g.l<sup>-1</sup>), důvodem mohlo být silné ovlivnění klimatických podmínek ročníku 2010, ve kterém u této odrůdy v experimentu chyběla první varianta. Jednoznačně nejvíce kyselin se tvořilo v hroznech odrůdy Ryzlink rýnský, průměrná hodnota ze všech měření činila  $11,9 \pm 1,1$  g.l<sup>-1</sup>, nejméně pak u odrůdy Sauvignon s průměrnou hodnotou  $9,9 \pm 0,8$  g.l<sup>-1</sup> (u odrůdy Rulandské šedé to byla hodnota  $10,1 \pm 0,4$  g.l<sup>-1</sup>). Korelace mezi velikostí listové plochy a obsahem titrovatelných kyselin nebyla potvrzena u žádné odrůdy. Druhá hypotéza, že hrozny na keřích s největší listovou plochou budou obsahovat nejvíce titrovatelných kyselin, byla na základě statistické významnosti experimentálně prokázána pouze u odrůdy Sauvignon v roce 2008 a 2010.

Závislost poměru jednotlivých organických kyselin na velikosti listové plochy nebyl ve všech případech jednoznačný. I když se v některých variantách ukázalo, že větší listová plocha na keři měla za následek vyšší tvorbu kyseliny jablečné než u keřů s menší listovou plochou, pravděpodobně to bylo důsledkem zastínění hroznů přerůstajícími letorosty. Při vyhodnocení korelační analýzy mezi obsahem titrovatelných kyselin, kyselinou jablečnou a mléčnou v hroznech byly zjištěny rozdíly

mezi jednotlivými odrůdami. U odrůdy Rulandské šedé byl nejvyšší korelační koeficient mezi titrovatelnými kyselinami a obsahem kyseliny vinné v hroznech u všech tří variant, nejvyšší však u druhé varianty ( $r = 0,9313$ ). U odrůd Sauvignon a Ryzlink rýnský byla vyšší korelace u všech variant mezi titrovatelnými kyselinami a kyselinou jablečnou v hroznech. U obou odrůd opět nejvyšší u první varianty (Sauvignon  $r = 0,9585$ , Ryzlink rýnský  $r = 0,9688$ ).

Výsledky experimentu ukazují, že velikost listové plochy má nepochybně vliv na složení hroznů. Nicméně působení klimatických podmínek a dalších faktorů v jednotlivých ročnících je tak výrazné, že potvrzení výsledků statistickými metodami bylo ve většině případů neprůkazné. Určit neoptimálnější velikost listové plochy však nelze pouze na základě získaných dat. Vždy je nutné znát požadavky, které si určíme před výrobou vína. Vyšší hodnoty rozpustné sušiny, které obsahují hrozny na keřích s větší listovou plochou, nemusí být optimální pro výrobu všech druhů vín. Stejně jako nižší, případně vyšší obsah kyselin. Výsledky práce mohou být tedy pomůckou pro vinohradníky, kteří by měli zájem ovlivnit složení vypěstovaných hroznů regulací listové plochy.

Při hodnocení vlivu přídavku čistých kultur mléčných bakterií na průběh jablečno-mléčné fermentace bylo sledováno celkem pět druhů preparátu (Lalvin 31, BioStar Vitale SK 11, Viniflora CH35, Viniflora Oenos, Enartis ML Silver) u tří odrůd červených vín (Frankovka, Merlot, Cabernet Moravia). Bylo potvrzeno, že přídavek čisté kultury do vína urychluje odbourávání kyseliny jablečné a v porovnání se spontánním odbouráváním trvalo vždy kratší dobu. Z pohledu rychlosti odbourání se ukázal být jako nejlepší preparát Viniflora CH35, u kterého došlo k dokončení jablečno-mléčné fermentace během 16 dnů. U preparátu Viniflora Oenos došlo v roce 2009 k odbourání kyseliny jablečné během 28 dnů u odrůdy Frankovka a 32 dnů u odrůdy Merlot. V roce 2010 trvalo u tohoto preparátu odbourání shodně u odrůdy Frankovka i Cabernet Moravia 32 dnů od inokulace. Při použití přípravku Enartis ML Silver došlo ve stejném roce k dokončení jablečno-mléčné fermentace během 50 dnů od inokulace. U spontánního průběhu kvašení nebyla kyselina jablečná kompletně odbourána (obsah méně než  $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ ) ani v jednom z případů. Experimentálně byla potvrzena hypotéza, o zkrácení doby potřebné na odbourání kyseliny jablečné přídavkem čistých kultur mléčných bakterií do vína za stejných podmínek.

Obsah titrovatelných kyselin a hodnoty pH souvisel s rychlostí odbourávání kyseliny jablečné. Statisticky prokazatelně nejmenší úbytky titrovatelných kyselin byly pozorovány u spontánního kvašení (průměrně došlo ke snížení obsahu titrovatelných kyselin o  $0,6 \pm 0,7 \text{ g.l}^{-1}$ ), ovšem tyto vína vykazovala na konci pozorování nejvyšší hodnoty pH, což negativně ovlivňuje stabilitu vína. K nejvyšším úbytkům titrovatelných kyselin docházelo u vín s preparátem Lalvin 31 ( $2,1 \pm 0,1 \text{ g.l}^{-1}$ ) a Enartis ML Silver ( $1,5 \pm 0,5 \text{ g.l}^{-1}$ ).

V roce 2010 byl sledován vývoj antioxidační kapacity v průběhu jablečno-mléčné fermentace u odrůd Frankovka a Cabernet Moravia. Největší nárůst byl u obou vín pozorován v prvních 15 dnech, antioxidační kapacita stanovená metodou DPPH se zvýšila u odrůdy Frankovka o  $0,58 \pm 0,05 \text{ mmol TE.l}^{-1}$  u vína odrůdy Cabernet Moravia o  $1,49 \pm 0,06 \text{ mmol TE.l}^{-1}$ , metodou FRAP o  $0,47 \pm 0,07 \text{ mmol TE.l}^{-1}$  u vína odrůdy Frankovka a u vína Cabernet Moravia o  $0,46 \pm 0,07 \text{ mmol TE.l}^{-1}$ . U vína odrůdy Frankovka byl pozorován vliv startovací kultury, kdy u preparátu Enartis ML Silver obsahovalo víno vyšší hodnoty antioxidační kapacity než u preparátu Viniflora Oenos, rozdíly mezi obsahy antioxidační kapacity byly statisticky průkazné. Vína odrůdy Cabernet Moravia vykazovala podobné hodnoty u obou preparátů. U spontánního odbourávání byly ve všech případech statisticky prokazatelně nejnižší obsahy antioxidační kapacity.

Z karbonylových sloučenin byly sledovány diacetyl, 2,3-pentandion a acetoin. Literární zdroje uvádí, že se koncentrace diacetylu v průběhu jablečno-mléčné fermentace zvyšuje, nejvíce byl tento růst pozorován u spontánního průběhu jablečno-mléčné fermentace. Nejvyšší naměřená hodnota  $10,8 \pm 1,5 \text{ mg.l}^{-1}$  byla u vína odrůdy Merlot po spontánním průběhu odbourávání. Obsahy 2,3-pentandionu byly ve všech vzorcích poměrně nízké, nejvyšší hodnota 2,3-pentandionu  $1,1 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  byla naměřena ve víně odrůdy Frankovka před jablečno-mléčnou fermentací v roce 2008. Nejvyšší hodnota acetoinu ( $20,2 \pm 1,3 \text{ mg.l}^{-1}$ ) byla u vína odrůdy Frankovka v roce 2008 po jablečno-mléčné fermentaci s přidavkem preparátu BioStar vitale SK11. Při spontánním kvašení byly zjištěny vždy nejvyšší obsahy diacetylu, které byly statisticky průkazné. Je tedy možné konstatovat, že experimentální výsledky potvrdily vyslovenou hypotézu o snížení množství vyprodukovaného diacetylu v průběhu jablečno-mléčné fermentace inokulací čistých kultur mléčných bakterií do vína.

V průběhu jablečno-mléčné fermentace docházelo ke snižování obsahu alkoholu nejvíce u vín s přídavkem startovacích kultur. U spontánního odbourávání byly ztráty nejnižší. U přídavku kultury Viniflora CH35 byl pozorován nejvyšší úbytek po jablečno-mléčné fermentaci ( $0,4 \pm 0,1$  % obj.). Pro vinařskou praxi však nemusí být zjištěné rozdíly mezi hodnotami podstatné.

Byl potvrzen vliv jablečno-mléčné fermentace na změnu barvy vína. Nejvyšší snížení červených tónů definovaných hodnotou  $a^*$  CIELAB barevného spektra bylo u vína odrůdy Cabernet Moravia při použití preparátu Viniflora Oenos, hodnota  $a^*$  na počátku odbourávání  $47,8 \pm 1,1$  klesla na hodnotu  $40,5 \pm 2,2$ . Naopak u spontánního odbourávání docházelo k nejvyšším nárůstům hodnoty  $b^*$ , což je způsobeno snížením modrých tónů, tedy degradací antokyanových barviv (z hodnoty  $2,6 \pm 2,6$  na  $3,5 \pm 2,8$  u vína odrůdy Frankovka, a u vína odrůdy Cabernet Moravia ze  $4,6 \pm 0,9$  na  $5,7 \pm 2,3$ ). Nejvyšší hodnota  $\Delta E$ , která udává míru velikosti rozdílů mezi barevnými změnami, byla u vína odrůdy Frankovka v roce 2010 ( $\Delta E = 7,25$ ), u spontánně odbouraného vína. U vína odrůdy Cabernet Moravia bylo nejvíce barevně odlišné víno s preparátem Viniflora Oenos ( $\Delta E = 8,53$ ). Víno odrůdy Merlot vykazovalo nejvyšší odlišnost v barvě vína při použití preparátu Viniflora CH35 ( $\Delta E = 9,44$ ). Vliv preparátu na míru velikosti rozdílů v barevném profilu vín nebyl potvrzen, protože každá odrůda reagovala odlišně na daný preparát.

Pro zdárný průběh jablečno-mléčné fermentace je rozhodujícím kritériem možnost tento proces určitým způsobem řídit. Výsledky této práce potvrzují, že přídavek kultur mléčných bakterií do vína zkrátí dobu potřebnou na odbourání. Při spontánním, tedy neřízeném průběhu, dochází k prodloužení doby jablečno-mléčné fermentace, k vyšší produkci diacetylu, nižší tvorbě antioxidantních látek, ale naopak dochází k menším ztrátám titrovatelných kyselin a alkoholu. Inokulace čistými kulturami mléčných bakterií je tedy jednoznačně možností, jak tento proces řídit a ovlivňovat.

## 6. SOUHRN

Disertační práce byla zaměřena na sledování vlivu velikosti listové plochy na vybrané jakostní parametry hroznů, na sledování průběhu jablečno-mléčné fermentace a možnosti jejího řízení.

V literárním přehledu jsou charakterizovány jednotlivé růstové fáze révy vinné, se zaměřením na změny látkového složení v hroznech. Detailně je popsán především mechanismus tvorby cukrů a kyselin v hroznech a jejich změny v průběhu dozrávání. Dále jsou charakterizovány možnosti regulace listové plochy a jejich vliv na složení hroznů. Další část je věnována biochemickým změnám v průběhu výroby vína. Především změnám ve složení vína v průběhu jablečno-mléčné fermentace.

Experimentální část vyhodnocuje vliv velikosti listové plochy na vybrané jakostní parametry hroznů (rozpuštná sušina, titrovatelné kyseliny, pH, kyselina vinná a jablečná) u odrůd Rulandské šedé, Sauvignon a Ryzlink rýnský, v letech 2008 až 2010. V první fázi byly změřeny velikosti listů u jednotlivých odrůd a vypočítány průměrné plochy listové plochy na jednom keři. Keře byly ošetřeny ve třech variantách s různou velikostí listové plochy. Z výsledků je patrné, že velikost listové plochy keře má pozitivní vliv především na akumulaci cukrů v hroznech. Obsah titrovatelných kyselin v hroznech byl nejvyšší na keřích s největší listovou plochou, i když vzhledem k velkým rozdílům mezi jednotlivými ročníky nebyl statisticky průkazný. Poměr kyseliny vinné a jablečné byl nejednoznačný s přihlédnutím na velikost listové plochy, stejně jako hodnota pH moštů.

Při pozorování vlivu přidaných čistých kultur mléčných bakterií na průběh jablečno-mléčné fermentace byly sledovány vína tří odrůd (Frankovka, Merlot a Cabernet Moravia) v letech 2008 až 2010. Účinek přídatku mléčných bakterií byl sledován u pěti preparátů (Lalvin 31, BioStar Vitale SK11, Viniflora Oenos, Viniflora CH35 a Enartis ML Silver) v porovnání se spontánním průběhem odbourávání. Bylo potvrzeno, že přídatek čistých kultur významně urychluje průběh jablečno-mléčné fermentace, zvyšuje antioxidační aktivitu vína, snižuje produkci diacetylu a dalších karbonylových sloučenin. Jablečno-mléčná fermentace měla za následek významné změny v barevnosti biologicky odbouraných červených vín.

## RESUME

The dissertation thesis focused on investigation of the influence of the leaf area on chosen quality parameters of grapes, on observation of the malolactic fermentation process and possibilities of its control.

Literary section of the thesis includes characteristics of individual phenophases of grape wine with emphasis on the changes of substances content of grapes. Mechanism of sugars and acids creation and modification in grapes during ripening is described in detail. Possibilities of leaf area regulation and their influence on substances content of grapes are characterized. Another section deals with biochemical changes during wine production, especially with changes in substances content of wine during malolactic fermentation.

The experimental part evaluates the influence of the leaf area on chosen quality parameters of grapes (soluble solids, titratable acids, pH, tartaric and malic acids content) of cultivars 'Pinot Gris', 'Sauvignon' and 'Riesling' in years 2008 – 2010. The leaf area of each variety was measured in the 1st phase and average leaf area of one bush was calculated. The bushes were treated in three variants with different leaf area. It is obvious that the leaf area of the bush has positive influence especially on accumulation of sugars in grapes. The content of titratable acids in grapes was the highest by the bushes with the largest leaf area, though it was not statistically significant because there were big differences among vintages. The malic and tartaric acid ratio was ambiguous with regard to the leaf area, pH value of musts was ambiguous too.

The influence of added pure cultures of lactic bacteria on the malolactic fermentation process was observed on three cultivars ('Blaufränkisch', 'Merlot', 'Cabernet Moravia') in the years 2008 to 2010. The effect of addition of lactic bacteria was observed on 5 preparations (Lalvin 31, BioStar Vitale SK11, Viniflora Oenos, Viniflora CH35 and Enartis ML Silver) and it was compared to spontaneous process of degradation. It was confirmed that the addition of pure cultures significantly accelerates the process of malolactic fermentation, it increases the antioxidant activity of wine, it decreases the production of diacetyl and other carbonyl compounds. Malolactic fermentation caused significant changes in color of biologically degraded red wines.



## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ABRAHAMSE C.E., BARTOWSKY E.J. Timing of malolactic fermentation inoculation in Shiraz grape must and wine: Influence on chemical composition. *World J. Microbiol. Biotech.* 2012, 28, 255–265.
2. ADAMBERG K., KASK S., LAHT T.M., PAALME T. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 85 (1-2), 171-183.
3. ALBERTO M.R., de NADRA M.C., ARENA M.E. Influence of phenolic compounds on the growth and arginine deiminase system in a wine lactic acid bacterium. *Braz. J. Microbiol.* 2012, 43(1),167-76.
4. ARENA M.E., de NADRA M.C. Influence of ethanol and low pH on arginine and citrulline metabolism in lactic acid bacteria from wine. *Res. Microbiol.* 2005, 156(8), 858-64.
5. ASENSTORFER R.E., MARKIDES A.J., ILAND P.G., JONES G.P. Formation of vitisin A during red wine fermentation and maturation. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2003, 9, 40-46.
6. AZZOLINI M., TOSI E., VAGNOLI P., KRIEGER S., ZAPPAROLI G.. Evaluation of technological effects of yeast–bacterial co-inoculation in red table wine production. *Italian Journal of Food Science.* 2010, 3 (22), 257–263.
7. BALÍK J. Hodnocení obsahu kyselin a kyselosti révových vín. *Vinařský obzor.* 2005, 98(7-8), 387-389.
8. BARNETT J.A. A history of research on yeasts 5: the fermentation pathway. *Yeast.* 2003, 20, 509–543.
9. BARNETT J.A., ENTIAN K.D. A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast.* 2005, 22, 835–894.
10. BAROŇ M. Biologické odbourání kyselin. *Vinařský obzor.* 2011, 104(10) 510-512.
11. BARTOWSKY E.J., HENSCHKE P.A. The ‘buttery’ attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 96, 235–252.
12. BARTOWSKI E. J., BORNEMAN A. R. Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Applied Microbiology Biotechnology.* 2011, 92, 441–447.
13. BAUER R., DICKS, L.M.T., Control of malolactic fermentation in wine. A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 2004, 25, 74-88.
14. BEELMAN R.B., GALLANDER J.F. Wine deacidification. *Adv. Food Res.* 1979, 25, 1–53.

15. BELY M., RINALDI A., DUBOURDIEU D. Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 2003, 96, pp. 507–512.
16. BELTRAN G., TORIJA M.J., NOVO M., FERRER N., POBLET M., GUILLAMÓN J.M., ROZES N., MAS A. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* 2002, 25, 287–293.
17. BENITO S., PALOMERO F., MORATA A., CELDERÓN F., SUÁREZ-LEPE J.A. New applications for *Schizosaccharomyces pombe* in the alcoholic fermentation of red wines. *International Journal of Food Science and Technology.* 2012, 47, 2101-2108.
18. BENITO S., PALOMERO F., MORATA A., CELDERÓN F., PALMERO D., SUÁREZ-LEPE J.A. Physiological features of *Schizosaccharomyces pombe* of interest in making of white wines. *Eur. Food Res. Technol.* 2013, 236, 29-36.
19. BENZIE I.F., STRAIN J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 1996, 239(1), 70-76.
20. BIDAN P., BONNEVIALE J.R. *Application à l'oenologie des progrès récents en microbiologie et en fermentation*, Paris: OIV. 1988, 133–143.
21. BOULTON R.B., SINGLETON V., BISSON L., KUNKEE R. *Principles and Practices of Winemaking*. London: Chapman & Hall. 1996, 244-374.
22. BOULTON R.B. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 2001, 52, 67-87
23. BOUSBOURAS G.E., KUNKEE R.E. Effect of pH on malolactic fermentation in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 1971, 22, 121–126.
24. BRION C., AMBROSET C., DELOBEL P., SANCHEZ I., BLONDIN B. Deciphering regulatory variation of THI genes in alcoholic fermentation indicate an impact of Thi3p on PDC1 expression. *BMC Genomics.* 2014,15(1), 1085.
25. BRAVO-FERRADA B., HOLLMANN A., DELFEDERICO L., VALDÉS LA HENS D., CABALLERO A., SEMORILE L. Patagonian red wines: selection of *Lactobacillus plantarum* isolates as potential starter cultures for malolactic fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 29(9), 1537–1549.
26. BUTTROSE M.S. Vegetative growth of grape-vine varieties under controlled temperature and light intensity. *Vitis.* 1969, 8, 280-285.
27. BURG P., ZEMÁNEK P. Hodnocení velikosti listové plochy u moštových odrůd révy vinné. *Vinařský obzor.* 2010. 103,7-8, 356-359.

28. BURNS T.R., OSBORNE J.P. Impact of Malolactic Fermentation on the Color and Color Stability of Pinot noir and Merlot Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 2013, 64(3), 370-377.
29. CAÑASA P.M.I., PÉREZ-MARTÍNC F., ROMEROA E.G., PRIETOC S.S., HERREROSC M.L. P. Influence of inoculation time of an autochthonous selected malolactic bacterium on volatile and sensory profile of Tempranillo and Merlot wines. *International Journal of Food Microbiology.* 2012, 156(3), 245-254.
30. CAÑASA P.M.I., ROMERO E.G., MARLIN F.P., PRIETO S.S., HERAS MANSO J.M., PALOP HERREROS M.L. Behaviour during Malolactic Fermentation of Three Strains of *Oenococcus oeni* Used as Direct Inoculation and Acclimatisation Cultures. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 2013, 34 (1)
31. CANDOLFI-VASCONCELOS M.C., KOBLET W. Yield, fruit quality, bud fertility and starch reserves of the wood as a function of leaf removal in *Vitis vinifera* - Evidence of compensation and stress recovering. *Vitis.* 1990, 29, 199-221.
32. CANDOLFI-VASCONCELOS M.C., KOBLET W. Influence of partial defoliation on gas exchange parameters and chlorophyll content of field grown grapevines. Mechanisms and limitations of the compensation capacity. *Vitis.* 1991, 30, 129-41.
33. CAROLUS M. *Recherches sur l'organogenese et l'evolution morphologique du bourgeon latent de la Vigne (Vitis vinifera L.) var. Medot.* Disertační práce. Universite de Bordeaux. 1970.
34. CARR F.J., CHILL D., MAIDA N. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 2002, 28, 281–370.
35. CAWTHON D.L., MORRIS J.R. Relationship of seed number and maturity to berry development, fruit maturation, hormonal changes, and uneven ripening of 'Concord' (*Vitis labrusca* L.) grapes. *Plant. Mol. Biol.* 1982, 107, 1097-1104
36. COOMBE B.G. Distribution of solutes with in the developing grape berry in relation to its morphology. *Am. J. Enol. Vitic.* 1987, 38, 120-127.
37. COOMBE B.G., DRY P.R. *Viticulture, 4th Edition, vol. 2.* Adelaide: Hyde Park Press. 1993, 340.
38. CORTELL J.M., HALBLEIB M., GALLAGHER A.V., RIGHETTI T.L., KENNEDY J.A. Influence of vine vigor on grape (*Vitis vinifera* cv Pinot Noir) anthocyanins. 1. Anthocyanin concentration and composition in fruit. *J. Agric. Food. Chem.* 2007, 55(16), 6575–6584.
39. COSTELLO P.J., FRANCIS I.L., BARTOWSKY E.J. Variations in the effect of malolactic fermentation on the chemical and sensory properties of Cabernet Sauvignon wine: Interactive influences of *Oenococcus oeni* strain and wine matrix composition. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2012, 18, 287–301.

40. ČUŠ F. The suitability of malolactic fermentation for the Cviček wine. *Acta agriculturae Slovenica*. 2013, 101, 93-103.
41. CZAPSKI J., MIKOŁAJCZYK K. BETALAINY W. *Aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne*. Warszawa: Grajek W. WNT Warszawa. 2007, s. 158-162.
42. DAVIS C.R., WIBOWO D., ESCHENBRUCH R., LEE T.H., FLEET G.H. Practical implications of malolactic fermentation: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 1985, 36, 290–301.
43. DAVIES C., WOLF T. ROBINSON S.P. Three putative sucrose transporters are differentially expressed in grapevine tissues. *Plant Sci.* 1999, 147, 93-100.
44. DE REVEL G., BERTRAND A., LONVAUD-FUNEL A. Synthèse des substances acétoïniques par *Leuconostoc oenos*. Réduction du diacétyle. *Connaiss. Vigne Vin*. 1989, 23, 39-45.
45. DE REVEL G., LONVAUD-FUNEL A., BERTRAND A. ' Etude des composés dicarbonylés au cours des fermentations alcoolique et malolactique, in OEnologie 95, 5 e Symposium international d'oenologie. A. Lonvaud, Tec et Doc, Pairs. 1996, 321–325.
46. DE REVEL G., PRIPIS-NICOLAU L., BARBE J.C., BERTRAND A. The detection of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds in wine by formation of quinoxaline derivatives. *J. Sci. Food Agric.* 2000, 80, 102-108.
47. DOKOOZLIAN N.K., WILLIAMS L.E., NEJA R.A. Chilling exposure and hydrogen cyanamide interact in breaking dormancy of grape buds. *Hort. Science* 1995, 30, 1244-1247.
48. DROŹDŹ I, SŁOWIK M, SROKA P., MAKAREWICZ M. Wpływ *Oenococcus oeni* na parametry enologiczne Polskich win gronowych. *Polish Food Technologist Society*. 2014, 3(94). 165-178.
49. FARKAŠ J. *Biotechnológia vína*, Bratislava: Vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry. 1983.
50. FLANZY C. *Oenologie: fondements scientifiques et technologiques*. Paris: Tec. Doc. Lavoisier. 1998, 454-497.
51. FLEET G.H., LAFON-LAFOURCADE S., RIBEREAU-GAYON P. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1984, 48, 1034–1038.
52. FLEET G.H. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Sydney: Department of Food Science and Technology The University of New South Wales. 1993.
53. FOX R., STEINBRENNER P. Laubarbeiten. Entblätterung hält gesund. *Das Deutsche Weinmagazin*, 2010, 12, 16-20.

54. FUGELSANG K., EDWARDS C. *Wine Microbiology Second Edition*, New York: Springer Science and Business Media. 2010, 29-179.
55. GALET P. *General Viticulture*. Chateau de Chaintre: Oenoplurimedia. 2000.
56. GELLER J.P., KURTURAL S.K. Mechanical Canopy and Crop-Load Management of Pinot gris in a Warm Climate. *Am. J. Enol. Vitic.* 2013, 64, 65-73.
57. GUIDONI, S., OGGERO, G., CRAVERO, S., RABINO, M., CRAVERO, M. C., BALSARI, P. Manual and mechanical leaf removal in the bunch zone (*Vitis vinifera* L., cv Barbera): effects on berry composition health, yield and wine quality, in a warm temperate area. *Journal international des sciences de la vigne et du vin*. 2008, 42, 49-58.
58. GUILLOUX-BENATIER M., PAGEAULT O., MAN A., FEUILLAT M. (). Lysis of yeast cells by *Oenococcus oeni* enzymes. *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, 2000, 25, 193–197.
59. GURY J., BARTHELMEBS L., TRAN N.P., DIVTES C., CAVIN, J.F. Cloning, deletion, and characterization of PadR, the transcriptional repressor of the phenolic acid decarboxylase-encoding padA gene of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70, 2146–2153.
60. HERJAVEC S., TUPAJIC P. MAJDAK A. Influence of malolactic fermentation on the quality of Riesling wine. *Agric. Conspec. Sci.* 2001, 66, 59- 64.
61. HOHMANN S. Pyruvate decarboxylases. In ZIMMERMAN F.K., ENTIAN K.D. *Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology, and Applications*, Boca Raton: CRC Press. 1996, 187–212.
62. HUBÁČEK V., KRAUS V. *Hrozny a víno z vinice i zahrady*. Praha: SZN. 1982.
63. INTRIERI C., FILIPPETTI I., Maturazione accelerata delle uve ed eccessivo grado alcolico dei vini: Cosa può fare la ricerca se cambia il clima? *Rivista di frutticoltura e di ortofloricoltura*. 2009, 71, 60-62.
64. JACKSON R.S. *Wine Science: Principles, practice and perception (2nd Ed.)*. San Diego: Academic Press. 2000.
65. JACOBSON J. *Introduction to Wine Laboratory Practices and Procedures*. New York: Springer Science and Business Media. 2010, 188-191.
66. JUSSIER D., MORNEAU A.D., MIRA DE ORDUÑA R.. Effect of simultaneous inoculation with yeast and bacteria on fermentation kinetics and key wine parameters in cool climate Chardonnay. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, 72, 221–227
67. KAČMÁROVÁ Z. *Hodnocení defoliace vinic s ohledem na rozsah redukce listové plochy*. 2011. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně.

68. KALATHENOS P., SUTHERLAND J.P., ROBERTS T.A. Resistance of some wine spoilage yeasts to combinations of ethanol and acids present in wine. *J. Appl. Bacteriol.* 1995, 78, 245.
69. KANDLER O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Avan. Leeuw. J. Microb.* 1983, 49, 209–224
70. KEDARE S.B, SINGH R.P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* 2011, 48(4), 412–422.
71. KLIEWER W.M., MAROIS J.J., BLEDSOE A.M., SMITH S.P., BENZ M.J., SILVESTRONI, O. Relative effectiveness of leaf removal, shoot positioning, and trellising for improving wine grape quality. *Proceedings of the Second International Symposium for Cool Climate Viticulture and Oenology*, NZ, Auckland. 1988, 123-126.
72. KLIEWER W.M., DOKOOZLIAN N.K. Leaf area/crop weight ratios of grapevines: influence on fruit composition and wine quality. *American Journal of Enology and Viticulture.* 2005, 56, 170–181.
73. KOZINA B., KAROGLAN M., HERJAVEC S., JEROMEL A., ORLIC S. Influence of basal leaf removal on the chemical composition of Sauvignon Blanc and Riesling wines. *Food, Agric. and Environm.* 2008, 1, 28-33.
74. KÖNIG H., FRÖHLICH J. *Lactic Acid Bacteria In Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, Berlin: Springer Berlin Heidelberg. 2009, 23-29.
75. KRAUS V. *Pěstujeme révu vinnou, 2. Aktualizované a rozšířené vydání*. Praha: Grada Publishing. 2012.
76. KRAUS, V. *Vinohradnictví II*. Brno: Vysoká škola zemědělská v Brně. 1979.
77. KRAUS, V. *Vinohradnictví: odrůdová agrotechnika*. Brno: Vysoká škola zemědělská v Brně. 1980.
78. KRAUS V., KOPEČEK J., KOTRBA M., KOUKAL V., KUČERA P., SEDLO J., VRBKA J. *Réva a víno v Čechách a na Moravě*. Praha: Radix. 1999, 110-112.
79. KRAUS V., FOFFOVÁ Z., VURM B., KRAUSOVÁ D. *Nová encyklopedie českého a moravského vína*. 1. díl, Praha: Praga Mystica, 2005, 167.
80. KRAUS V., HUBÁČEK V., ACKERMANN P. *Rukověť vinaře*. Praha: nakladatelství Brázda, spol. s r. o., 2010, 109-124.
81. KUMŠTA M. Hydroxyskořicové kyseliny – Část 2.: Těkavé fenoly. *Vinařský obzor.* 2007, 7-8, 364-365.
82. LAFON-LAFOURCADE S., GENEIX C., RIBEREAU-GAYON P. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environm. Microbiol.* 1984, 47, 1246–1249.

83. LAGUNAS R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1993, 16, 229–242.
84. LANG G.A., EARLY J.D., MARTIN G.C., DARNELL R.L. Endo-,para-, and codormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *Hort. Science*, 1987, 22, 371-377.
85. LE TRAON-MASSON M.P., PELLERIN P. Purification and characterization of two-D-glucosidases from an *Aspergillus niger* enzyme preparation: affinity and specificity toward glucosylated compounds characteristic of the processing of fruits. *Enzyme Microb. Technol.* 1998, 22, 374–382.
86. LEE G., EVANS K.J., MERRY A.M. Leaf growth characteristics of *Vitis vinifera* and prediction of final lamina length for studies of powdery mildew. *Ann. of Appl. Biol.*
87. LERM E., ENGELBRECHT L., TOIT M. Malolactic fermentation: The ABC's of MLF. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 2010, 31, 186–212.
88. LERM E., ENGELBRECHT L., TOIT M. Selection and characterisation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as malolactic fermentation starter cultures. *S. Afric. J. Enol. Vitic.* 2011, 32, 280–295
89. LIU S.Q.. Malolactic fermentation in wine—beyond deacidification. *J. Appl. Microbiol.* 2002, 92, 589–601.
90. LOBIT P., GENARD M., SOING P., HABIB, R. Modelling malic acid accumulation in fruits: relationships with organic acids, potassium, and temperature. *Journal of Experimental Botany.* 2006, 57(6), 1471-1483.
91. LONVAUD-FUNEL A., DESENS C. Constitution en acides gras des membranes des bacteries lactiques du vin. Incidences des conditions de culture. *Sci. Aliments.* 1990, 10, 817–829
92. LÓPEZ I., LÓPEZ R., SANTAMARÍA P., TORRES C., RUIZ-LARREA F. Performance of malolactic fermentation by inoculation of selected *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains isolated from Rioja red wines. *Vitis.* 2008, 47, 123-129.
93. MAIN G.L., THRELFALL R.T., MORRIS J.R. Reduction of Malic Acid in Wine Using Natural and Genetically Enhanced Microorganisms. *Am. J. Enol. Vitic.* 2007, 58(3), 341-345.
94. MALHERBE S., TREDOUX A., NIEUWOUDT H., DU TOIT M. Comparative metabolic profiling to investigate the contribution of *O. oeni* MLF starter cultures to red wine composition. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 39, 477–494.
95. MARGALIT Y. *Winery Technology & Operations A Handbook for Small Wineries*. San Francisco: The Wine Appreciation Guild. 1996, 75-184.

96. MARTINEAU B., HENICK-KLING, T. ACREE T.E. Reassessment of the influence of malolactic fermentation on the concentration of diacetyl in wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 1995, 46, 385-388.
97. MARTÍNEZ DE TODA F., SANCHA J.C., BALDA P. Reducing the Sugar and pH of the Grape (*Vitis vinifera* L. cvs. 'Grenache' and 'Tempranillo') Through a Single Shoot Trimming. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 2013, 34(2), 246-251.
98. MAY P., CLINGELEFFER P.R., BRIEN C.J. Sultana canes and their exposure to light. *Vitis.* 1967, 14, 278-288.
99. MAY P. From bud to berry, with special reference to inflorescence and bunch morphology in *Vitis vinifera* L. *Aust. J. Wine Res.* 2000, 6, 82-98
100. MILLAN C. ORTEGA J.H. Production of Ethanol, Acetaldehyde, and Acetic Acid in Wine by Various Yeast Races: Role of Alcohol and Aldehyde dehydrogenase, *J. of Enol. and Vitic.*, 1988, 39, 107-112.
101. MILLS L.J., FERGUSON J.C., KELLER M.. Cold-hardiness evaluation of grapevine buds and cane tissues. *Am. J. Enol. Vitic.* 2006, 57, 194-200.
102. MORATA A., GOMEZ-CORDOVES M.C., COLOMO B., SUAREZ J.A. Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strains of *Saccharomyces*: Relationship with vitisin A and B formation in red wines. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 7402-7409.
103. MORENO-ARRIBAS M.V., POLO, C.M. *Wine Chemistry and Biochemistry.* Berlin: Springer. 2009, 3-27.
104. MORTIMER R., POLSINELLI M. On the origin of wine yeast. *Res. Microbiol.*, 1999, 150, 199-204.
105. MULLINS M.G., BOUQUET A., WILLIAMS L.E. *Biology of the grapevine.* Cambridge: Cambridge University press. 2003.
106. NAOR A., GAL Y., BRAVDO B. Shoot and Cluster Thinning Influence Vegetative Growth, Fruit Yield, and Wine Quality of 'Sauvignon blanc' Grapevines. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2002, 127(4), 628-634.
107. NAOURI P., CHAGNAUD P., ARNAUD A., GALZY P. Purification and properties of a malolactic enzyme from *Leuconostoc oenos* ATCC 23278. *J. Basic Microbiol.* 1990, 30, 577-585.
108. NIELSEN J.C., PRAHL C., LONVAUD-FUNEL A. Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze-dried *Leuconostoc oenos* cultures. *American journal of enology and viticulture.* 1996, 47, 42-48.
109. OLLAT N., DIAKOU-VERDIN P., CARDE J.P., BARRIEU F., GAUDILLÈRE J.P. AND MOING A. Grape berry development: a review. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 2002, 36, 109-131.



- 110.OSBORNE J.P., MIRA DE ORDUÑA R., PILONE G.J., LIU S.Q. Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000, 191, 51-55.
- 111.OSBORNE J., EDWARDS C.H. Bacteria important during winemaking. *Adv. In Food And Nutr. Res.* 2005, 50, 140 - 177.
- 112.OSBORNE J., EDWARDS C.H. Inhibition of MLF by a peptide produced by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, 118, 27–24.
- 113.OUGH C.S. Fermentation rates of juice.I. Effects of temperature and composition on white juice fermentation rates. *Am. J. Enol. Vitic.* 1964, 15, 167–177.
- 114.OUGH C.S. *Winemaking basics*. New York: Food Product Press, 1992, 335 p. ISBN 1-56022-006-6.
- 115.PAPAGIANNI M. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 3, 2012.
- 116.PAVLOUŠEK P. *Pěstování révy vinné v zahradách*. Brno: Computer Press Books. 2005.
- 117.PAVLOUŠEK P. *Encyklopedie révy vinné*. Brno: Computer Press Books. 2007.
- 118.PAVLOUŠEK P. Zralost hroznů: Cukernatost a kyseliny. *Vinařský obzor*. 2008, 6, 280.
- 119.PAVLOUŠEK P. *Pěstujeme stolní odrůdy révy vinné*. Praha: Grada Publishing, a. s. 2009.
- 120.PAVLOUŠEK P. *Výroba vínu u malovinařů – 2., aktualizované a rozšířené vydání*. Praha: Grada Publishing a.s., 2010.
- 121.PAVLOUŠEK P. *Pěstování révy vinné, moderní vinohradnictví*. Praha: Grada Publishing, a. s., 2011, 64-208.
- 122.PAVLOUŠEK P. Brzký termín odlistění zóny hroznů, nový pohled na agrotechniku révy vinné. *Vinařský obzor*. 2012, 12, 608-611.
- 123.PERCIVAL D.C., FISHER K.H., SULLIVAN J.A. Use of Fruit Zone Leaf Removal With *Vitis vinifera* L. cv. Riesling Grapevines. II. Effect on Fruit Composition, Yield, and Occurrence of Bunch Rot (*Botrytis cinerea* Pers.:Fr.). *Am. J. Enol. Vitic.* 1994, 45(2), 133-140.
- 124.PETGEN M., REBHOLZ F. *Entblätterung. 1. vyd.* Neustadt: Meiningen. 2004, 60.
- 125.PETRIE P.R., TROUGHT M.C.T. HOWELL G.S. Influence of leaf ageing, leaf area and crop load on photosynthesis, stomatal conductance and senescence of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir) leaves. *Vitis*. 2000, 39, 31–36.

126. PETRIE P.R., TROUGHT M.C.T., HOWELL G.S., BUCHAN G.D. The effect of leaf removal and canopy height on whole-vine gas exchange and fruit development of *Vitis vinifera* L. Sauvignon Blanc. *Functional Plant Biology*. 2003, 30(6) 711 – 717.
127. PONI S., GIACHINO E. Growth, photosynthesis and cropping of potted grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) in relation to shoot trimming. *Aus. J. of Grape and Wine Res.* 2000, 6, 216–226.
128. PONI S., INTRIERI C. Grapevine photosynthesis: Effects linked to light radiation and leaf age. *Adv. in Hort. Sci.* 2001, 15, 5-15.
129. PONI S., BERNIZZONI F., CIVARDI S. The effect of early leaf removal on whole-canopy gas exchange and vine performance of *Vitis vinifera* L. “Sangiovese”. *Vitis*. 2008, 47, 1-6.
130. POSPÍŠILOVÁ D., SEKERA D., RUMAN T. *Ampelografia Slovenska*. Bratislava: Výskumná a šľachtiteľská stanica vinárska a vinohradnícka Modra, n. o. 2005.
131. POUGET R. *Recherches physiologiques sur le repos végétatif de lavigne (Vitis vinifera L.) la dormance des bourgeons et le mécanisme de sa disparition*. Disertační práce. Nat. Bordeaux et Ann. Amel. Plantes Nà h.s. 1963.
132. POUGET R. Methodo d'appréciation de l'évolution physiologique des bourgeons pendant la phase de predebourrement: Application a l'étude comparée du debourrement de la vigne. *Vitis*. 1967, 6, 294-302.
133. POZO-BAYÓN M.A., ALEGRÍA E.G., POLO M.C., TENORIO C., MARTÍN-ÁLVAREZ P.J., DE LA BANDA M.T.C., RUIZ-LARREA F. MORENO-ARRIBAS M.V. Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53, 8729–8735.
134. PRATT C. Reproductive anatomy in cultivated grapes - a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 1971, 22, 92-109.
135. PRETORIUS I.S., VAN DER WESTHUIZEN T.J., AUGUSTYN O.P.H. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 1999, 20, 61–74.
136. PRIOR B., *Qualitätssteigerung durch mechanische Eingriffe in die Laubwandstruktur und Ertragsleistung der Rebe*. St. Laurent: Pfeddersheimer Hochberg. 2006.
137. PROCHÁZKA, S., et al. *Botanika: Morfologie a fyziologie rostlin*. 2 nezm. vyd. Brno: MZLU v Brně, 2005.
138. RACKER E. History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Mol. Cell. Biochem.* 1974, 5, 17–23.

139. REGUANT C., CARERETÉ R., FERRER N., BORDONS A. Molecular analysis of *Oenococcus oeni* population dynamics and the effect of aeration and temperature during alcoholic fermentation on malolactic fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*. 2005, 40, 451–459.
140. REHM H.J., REED G. *Biotechnology, Food and Feed Production with Microorganisms*, Weinheim: Verlag Chemie. 1983, 5, 81–163.
141. RENOUF V., DELAHERCHE A., CLAISSE O., LONVAUD-FUNEL A. Correlation between indigenous *Oenococcus oeni* strain resistance and the presence of genetic markers. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 35, 27–33.
142. REYNOLDS A.G., EDWARDS, C.G., WARDLE, D.A., WEBSTER D.R., DEVER, M. Shoot Density Affects ‘Riesling’ Grapevines I. Vine Performance. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1994, 119(5), 874-880.
143. RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD E. RIBEREAU-GAYON P. *In Trait'e d'OEnologie*. Sciences et Techniques du Vin, vol. 2. Paris: Dunod. 1975.
144. RIBÉREAU-GAYON P., DUBOURDIEU D., DONÉCHE B., LONVAUD A. *In Handbook of Enology. Microbiology of Wine and Vinification*. Wiley: Chichester. 2006.
145. ROBINSON S.P., DAVIES C. Molecular biology of grape berry ripening. *Aust. J. Grape and Wine Res.* 2000, 6, 175-188.
146. ROBINSON J. *The Oxford Companion to Wine Third Edition*. Oxford: Oxford University Press. 2006, 422-508.
147. ROGIERS S.Y., HATFIELD J.M., JAUDZEMS V.G., WHITE R.G., KELLER M.. Grape berry cv. Shiraz epicuticular wax and transpiration during ripening and preharvest weight loss. *Am. J. Enol. Vitic.* 2004, 55, 121-127.
148. ROMANO P., SUZZI G., TURBANTI L., POLSINELLI M. Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts, *FEMS Microbial. Lett.* 1994, 118, 213-218.
149. ROSI I., FIA G., CANUTI V. Influence of different pH values and inoculation time on the growth and malolactic activity of a strain of *Oenococcus oeni*. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2003, 9, 194–9.
150. RUFFNER H.P., BREM S., RAST D.M. Pathway of Photosynthetic Malate Formation in *Vitis vinifera*. *Plant Physiol.*, 1983, 73, 582.
151. SABLAYROLLES J.M., BARRE, P. Evaluation des besoins en oxygene de fermentations alcooliques en conditions oenologiques sil'ees. *Sci. Aliments*, 1986, 6, 373–383.
152. SABLAYROLLES J. M., DUBOIS C., MANGINOT C., ROUSTAN J.L., BARRE P. Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for

- completion of sluggish and stuck wine fermentations. *J. Ferm. Bioeng.* 1996, 82, 377 – 381.
- 153.SALMON J.M., VEZINHET F., BARRE P. Anabolic role of L-malic acid in *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobiosis during alcoholic fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1987, 42, 213–220.
- 154.SEBBATINI P., HOWELL G.S. Effects of Early Defoliation on Yield, Fruit Composition, and Harvest Season Cluster Rot Complex of Grapevines. *Hort. Science.* 2010, 45(12), 1804-1808.
- 155.SEMON M.J., EDWARDS C.G., FORSYTH D., DINN C. Inducing malolactic fermentation in Chardonnay musts and wines using different strains of *Oenococcus oeni*. *Australian Journal of Grape and Wine Research.* 2001, 7, 52–59.
- 156.SHIMAZU Y., UEHARA M., WATANABE M. Transformation of citric acid to acetic acid, acetoin and diacetyl by wine making lactic acid bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 1985, 49, 2147-2157.
- 157.SCHÜTZ M., RADLER F. Das Vorkommen von Malatenzym und Malo-Lactat-Enzym bei verschiedenen Milchsäurebakterien. *Arch. Mikrobiol.* 1974, 96(4), 329–339.
- 158.SCHULTZ H.R. Photosynthesis of sun and shade leaves of field-grown grapevine. (*Vitis vinifera* L.) in relation to leaf age. *Vitis.* 1993, 32, 197-205.
- 159.SIEIRO C., CANSADO J., AGRELO D., VELÁZQUEZ J.B., VILLA T.G. Isolation and enological characterization of malolactic bacteria from the vineyards of northwestern Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990, 56, 2936–2938.
- 160.SKENE K.G.M., HALE C.R. Organic acid synthesis by grape berries cultured in vitro. *Phytochemistry.* 1971, 10(8), 1779-1781.
- 161.SMART R. Fruit exposure, the final word? *Aus. and New Z. Wine Ind. J.* 2002, 17, 74-75.
- 162.SPERRY J.S., HOLBROOK N.M., ZIMMERMANN M.H., TYREE M.T. Spring filling of xylem vessels in wild grapevine. *Plant Physiol.* 1987, 83, 414-417.
- 163.STEIDL R. *Sklepní hospodářství*. Praha: Nakladatelství Radix, spol. s. r. o. 2002.
- 164.STOLL, M., SCHEIDWEILER, M., LAFONTAINE, M. & SCHULTZ, H.R. Possibilities to reduce the velocity of berry maturation through various leaf area to fruit ratio modifications in *Vitis vinifera* L. Riesling. Proc. XVI GESCO Symposium, Davis, USA. 2009, 93 – 96.
- 165.STOLL M., BISCHOFF-SCHAEFER M., LAFONTAINE M., TITTMAN S., HENSCHKE J. Impact of Various Leaf Area Modifications on Berry Maturation in *Vitis vinifera* L. ‘Riesling’. *Acta Hort.*. 2013, 978, 293-299.

- 166.SUMBY K.M., GRBIN P.R., JIRANEK V. Implications of new research and technologies for malolactic fermentation in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 98, 8111–8132.
- 167.SUN S.Y., CHE CH. Y., SUN T.F., LV Z.Z., HE S.X., GU H.N., SHEN W.J. CHI D.CH.GAO Y. Evaluation of sequential inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains on the chemical and aromatic profiles of cherry wines. *Food Chemistry.* 2013, 138, 2233–2241.
- 168.SWEETMAN C., DELUC L.G., CRAMER G.R., FORD C.M., SOOLE K.L. Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry.* 2009, 70(11–12), 1329-1344.
- 169.SWIEGERS J., BARTOWSKY E., HENSCHKE P., PRETORIUS I. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape. Wine. Res.* 2005, 11, 139–173.
- 170.TARDAGUILA J., MARTINEZ de TODA F., PONI S., DIAGO M.P. Impact of Early Leaf Removal on Yield and Fruit and Wine Composition of *Vitis vinifera* L. Graciano and Carignan. *Am. J. Enol. Vitic.* 2010, 61(3), 372-381.
- 171.TROMP J. Dormancy. In: TROMB J., WEBSTER A.D., WERTHEIM S.J. *Fundamental of Temperate Zone Tree Fruit Production.* Wertheim: Backhuys Publ. 2005.
- 172.VAILIANT H., FORMISYN P., GERBAUX V. Malolactic fermentation of wine: study of the influence of some physico-chemical factors by experimental design assays. *J. Appl. Bacteriol.* 1995, 79, 640–650.
- 173.WINKLER A.J., COOK J.A., KLIEWER W.M., LIDER L.A.. The grape flower and berry set. In: *General Viticulture.* Los Angeles: University of California Press. 1974, 117-137.
- 174.ZAMBONI M., BAVARESCO L., KOMJANC R. Influence of bud number on growth, yield, grape and wine quality of 'pinot Gris', 'pinot noir' and 'sauvignon' (*Vitis vinifera* L.). *Act. Hort.* 1996, 427, 411-417.
- 175.ZAPPAROLI G., MOSER M., DELLAGLIO F., TOURDOT-MARECHAL R., GUZZO J. Typical metabolic traits of two *Oenococcus oeni* strains isolated from Valpolicella wines. *Lett. Appl. Microbiol.* 2004, 39, 48–54.
- 176.ZHANG D., LOVITT R.W. Strategies for enhanced malolactic fermentation in wine and cider maturation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.* 2006, 81, 1130-1140.
- 177.ZIMMERMAN F.K., ENTIAN K.D. *Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology, and Applications.* Boca Raton: CRC Press. 1997, 213–224.
- 178.ZOECKLEIN B.W., WOLF T.K, DUNCAN N.W., JUDGE, J.M, COOK M.K. Effects of Fruit Zone Leaf Removal on Yield, Fruit Composition, and Fruit Rot

Incidence of Chardonnay and White Riesling (*Vitis vinifera* L.) Grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 1992, 43(2), 139-148.

179.ZOECKLEIN B.W., FUGELSANG K., GUMP B., NURY F. *Wine Analysis and Production*. New York: Kluwer Academic Publishers. 1999, 160-447.

180.ZUFFEREY V., MURISIER P., VIVIN P., BELCHER S., LORENZINI F., SPRING J.L., VIRET O. Carbohydrate reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L. 'Chasselas'): The influence of the leaf to fruit ratio. *Vitis*. 2012, 51(3), 103-110.

## SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1: Vývoj počtu bakterií v průběhu výroby vína od počátku alkoholového kvašení
- Obrázek 2: Průměrné měsíční teploty v letech 2008 – 2010 na viniční trati Sonberk
- Obrázek 3: Měsíční hodnoty úhrnu srážek a slunečního svitu v letech 2008 – 2010 na viniční trati Sonberk
- Obrázek 4: difenylpikrylhydrazyl
- Obrázek 5: difenylpikrylhydrazin
- Obrázek 6: Rozpustná sušina v hroznech odrůdy Rulandské šedé v roce 2008 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře
- Obrázek 7: Rozpustná sušina v hroznech odrůdy Rulandské šedé v roce 2009 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře
- Obrázek 8: Rozpustná sušina v hroznech odrůdy Rulandské šedé v roce 2010 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře
- Obrázek 9: Korelační analýza mezi velikostí listové plochy keře a obsahem rozpustné sušiny v hroznech odrůdy Rulandské šedé
- Obrázek 10: Rozpustná sušina v hroznech odrůdy Sauvignon v roce 2008 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře
- Obrázek 11: Rozpustná sušina v hroznech odrůdy Sauvignon v roce 2009 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře
- Obrázek 12: Rozpustná sušina v hroznech odrůdy Sauvignon v roce 2010 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře
- Obrázek 13: Rozpustná sušina v hroznech odrůdy Ryzlink rýnský v roce 2008 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře
- Obrázek 14: Rozpustná sušina v hroznech odrůdy Ryzlink rýnský v roce 2009 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře
- Obrázek 15: Rozpustná sušina v hroznech odrůdy Ryzlink rýnský v roce 2010 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře
- Obrázek 16: Titrovatelné kyseliny v hroznech odrůdy Rulandské šedé v roce 2008 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře
- Obrázek 17: Titrovatelné kyseliny v hroznech odrůdy Rulandské šedé v roce 2009 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře
- Obrázek 18: Titrovatelné kyseliny v hroznech odrůdy Rulandské šedé v roce 2010 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře
- Obrázek 19: Titrovatelné kyseliny v hroznech odrůdy Sauvignon v roce 2008 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře
- Obrázek 20: Titrovatelné kyseliny v hroznech odrůdy Sauvignon v roce 2009 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře
- Obrázek 21: Titrovatelné kyseliny v hroznech odrůdy Sauvignon v roce 2010 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře
- Obrázek 22: Titrovatelné kyseliny v hroznech odrůdy Ryzlink rýnský v roce 2008 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře

Obrázek 23: Titrovatelné kyseliny v hroznech odrůdy Ryzlink rýnský v roce 2009 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy keře

Obrázek 24: Titrovatelné kyseliny v hroznech odrůdy Ryzlink rýnský v roce 2010 v závislosti na termínu odběru a velikosti listové plochy

Obrázek 25: Organické kyseliny a pH v hroznech odrůdy Rulandské šedé v roce 2008

Obrázek 26: Organické kyseliny a pH v hroznech odrůdy Rulandské šedé v roce 2009

Obrázek 27: Organické kyseliny a pH v hroznech odrůdy Rulandské šedé v roce 2010

Obrázek 29: Organické kyseliny a pH v hroznech odrůdy Sauvignon v roce 2008

Obrázek 30: Organické kyseliny a pH v hroznech odrůdy Sauvignon v roce 2009

Obrázek 31: Organické kyseliny a pH v hroznech odrůdy Sauvignon v roce 2010

Obrázek 32: Korelační analýza mezi obsahem kyseliny jablečné a titrovatelných kyselin u hroznů odrůdy Sauvignon u druhé varianty ošetření

Obrázek 33: Organické kyseliny a pH v hroznech odrůdy Ryzlink rýnský v roce 2008

Obrázek 34: Organické kyseliny a pH v hroznech odrůdy Ryzlink rýnský v roce 2009

Obrázek 35: Organické kyseliny a pH v hroznech odrůdy Ryzlink rýnský v roce 2010

Obrázek 36: Korelační analýza mezi obsahem kyseliny jablečné a titrovatelných kyselin u hroznů odrůdy Ryzlink rýnský u druhé varianty ošetření

Obrázek 37: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Frankovka, při použití preparátu Lalvin 31

Obrázek 38: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Frankovka, při použití preparátu BioStart Vitale SK11

Obrázek 39: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Frankovka, bez inokulace mléčnými bakteriemi

Obrázek 40: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Frankovka, při použití preparátu Viniflora Oenos

Obrázek 41: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Frankovka, při použití preparátu Viniflora CH35

Obrázek 42: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Merlot, bez inokulace mléčnými bakteriemi

Obrázek 43: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Merlot, při použití preparátu Viniflora Oenos

Obrázek 44: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Merlot, při použití preparátu Viniflora CH35

Obrázek 45: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Frankovka, bez inokulace mléčnými bakteriemi

Obrázek 46: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Frankovka, při použití preparátu Enartis ML Silver

Obrázek 47: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Frankovka, při použití preparátu Viniflora Oenos

Obrázek 48: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Cabernet Moravia, bez inokulace mléčnými bakteriemi



Obrázek 49: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Cabernet Moravia, při použití preparátu Enartis ML Silver

Obrázek 50: Změny organických kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vína odrůdy Cabernet Moravia, při použití preparátu Viniflora Oenos

Obrázek 51: Změny titrovatelných kyselin a pH v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vín odrůdy Frankovka v roce 2008

Obrázek 52: Změny titrovatelných kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vín odrůdy Frankovka v roce 2009, v závislosti na druhu preparátu mléčných bakterií a počtu dnů od inokulace

Obrázek 53: Změny titrovatelných kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vín odrůdy Merlot v roce 2009, v závislosti na druhu preparátu mléčných bakterií a počtu dnů od inokulace

Obrázek 54: Změny titrovatelných kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vín odrůdy Frankovka, při použití inokulačních preparátů Enartis ML Silver a Viniflora Oenos

Obrázek 55: Změny titrovatelných kyselin v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vín odrůdy Cabernet Moravia, při použití inokulačních preparátů Enartis ML Silver a Viniflora Oenos

Obrázek 56: Změny antioxidační kapacity v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vín odrůdy Frankovka, měřené metodou DPPH

Obrázek 57: Změny antioxidační kapacity v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vín odrůdy Frankovka, měřené metodou FRAP

Obrázek 58: Změny antioxidační kapacity v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vín odrůdy Cabernet Moravia, měřené metodou DPPH

Obrázek 59: Změny antioxidační kapacity v průběhu jablečno-mléčné fermentace u vín odrůdy Cabernet Moravia, měřené metodou FRAP

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Průměrná plocha listu sledovaných odrůd révy vinné v letech 2008 - 2010

Tabulka 2: Průměrná velikost listové stěny na 1 keři u sledovaných odrůd révy vinné v letech 2008 - 2010

Tabulka 3: Hodnoty korelačních koeficientů mezi obsahem titrovatelných kyselin, kyseliny vinné a jablečné v závislosti na velikosti listové plochy keře u odrůdy Rulandské šedé

Tabulka 4: Souhrn hodnot kyselin u hroznů odrůdy Rulandské šedé za celé experimentální období

Tabulka 5: Hodnoty korelačních koeficientů mezi obsahem titrovatelných kyselin, kyseliny vinné a jablečné v závislosti na velikosti listové plochy keře u odrůdy Sauvignon

Tabulka 6: Souhrn hodnot kyselin u hroznů odrůdy Sauvignon za celé experimentální období

Tabulka 7: Hodnoty korelačních koeficientů mezi obsahem titrovatelných kyselin, kyseliny vinné a jablečné v závislosti na velikosti listové plochy keře u odrůdy Ryzlink rýnský

Tabulka 8: Souhrn hodnot kyselin u odrůdy Ryzlink rýnský za celé experimentální období

Tabulka 9: Souhrnná tabulka k hodnotám kyseliny jablečné a mléčné u vín odrůdy Frankovka v roce 2008

Tabulka 10: Souhrnná tabulka k hodnotám kyseliny jablečné a mléčné u vín odrůdy Frankovka v roce 2009

Tabulka 11: Tabulka 11: Souhrnná tabulka k hodnotám kyseliny jablečné a mléčné u vín odrůdy Merlot v roce 2009

Tabulka 12: Tabulka 12: Souhrnná tabulka k hodnotám kyseliny jablečné a mléčné u vín odrůdy Frankovka v roce 2010

Tabulka 13: Souhrnná tabulka k hodnotám kyseliny jablečné a mléčné u vín odrůdy Cabernet Moravia v roce 2010

Tabulka 14: Změny v obsahu vybraných karbonylových sloučenin a kyseliny citronové ve víně v závislosti na druhu použitého preparátu mléčných bakterií

Tabulka 15: Změny obsahu alkoholu ve víně vlivem jablečno-mléčné fermentace

Tabulka 16: Změny v barevných hodnotách  $L^*a^*b^*$  u červených vín vlivem jablečno-mléčné fermentace

Tabulka 17: Hodnoty barevných změn vyjádřených pomocí  $\Delta E$  u vín s použitými inokulačními preparáty mléčných bakterií