

**Mendelova univerzita v Brně
Záhradnická fakulta v Lednici**

BAKALÁRSKA PRÁCA
Kvasinky *Brettanomyces bruxelensis* v technologii vín

Vedúci bakalárskej práce
doc. Ing. Mojmír Baroň, Ph.D.

Vypracoval
Matej Mešťánek

Lednice 2017

Prehlásenie

Prehlasujem, že som bakalársku prácu na tému Kvasinky *Brettanomyces Bruxellensis* v technológii vín vypracoval samostatne a použil len pramene, ktoré uvádzam v priloženom súpise literatúry. Súhlasím, aby moja práca bola zverejnená v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách v znení neskorších predpisov a v súlade s platnou Smernicou o zverejňovaní vysokoškolských záverečných prác.

Som si vedomý, že sa na moju prácu vzťahuje zákon č. 121/2000Sb., autorský zákon a že Mendelova Univerzita v Brně má právo na uzatvorenie licenčnej zmluvy a užitia tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 autorského zákona.

Ďalej a zaväzujem, že pred spísaním licenčnej zmluvy o využití diela inou osobou (subjektom) si vyžiadam písomné stanovisko univerzity, že predmetná licenčná zmluva nie je v rozpore s oprávnenými záujmami univerzity a zaväzujem sa uhradiť prípadný príspevok na úhradu nákladov spojených so vznikom diela a to až do ich skutočnej výšky.

V Lednici, dňa 3.5.2017

.....
Matej Mešťánek

POĎAKOVANIE

Touto cestou by som chcel poďakovať vedúcemu bakalárskej práce doc. Ing. Mojmírovi Baroňovi, Ph.D. za možnosť venovať sa skúmanej problematike v rámci záverečnej práce. Taktiež by som rád poďakoval mojej rodine, priateľke a Krištofovi Martinákovi za pomoc a podporu.

Obsah

1	ÚVOD.....	4
2	CIEĽ PRÁCE	5
3	LITERÁRNA ČASŤ	6
3.1	História.....	6
3.2	Pôvodca.....	7
3.2.1	Kvasinky <i>Brettanomyces</i>	7
3.3	Zdroje infekcie	8
3.4	Tvorba prchavých fenolov	10
3.4.1	Hydroxyškoricové kyseliny ako prekurzory	10
3.4.2	Hydroxyškoricové kyseliny v hrozne a mušte.....	11
3.4.3	Vplyv spracovania	11
3.4.4	Transformácia prchavých fenolov	12
3.4.5	Enzymatická premena	12
3.4.6	Ostatné mikroorganizmy tvoriace prchavé fenoly	13
3.4.7	Ďalšie produkty <i>Brettanomyces</i>	13
3.4.8	Ďalšie vplyvy na kvalitu vína.....	15
3.4.9	Podmienky pre vznik a rozvoj infekcie	15
3.5	Senzorické prejavy	16
3.6	Riešenie problematiky a prípadná ochrana	17
3.6.1	Hygiena.....	17
3.6.2	Fyzikálne a mechanické metódy	18
3.6.3	Chemické metódy.....	19
3.7	Metódy stanovenia animálnych tónov a kvasiniek <i>Brettanomyces</i>	22
3.7.1	VBNC stav.....	22

3.7.2	Spôsoby identifikácie <i>Brettanomyces</i>	22
3.7.3	Senzorická analýza	24
3.7.4	Stanovenie animálnych tónov pomocou GC- MS	24
3.8	Problematika animálnych tónov vo svete	25
3.8.1	Taliansko	25
3.8.2	Španielsko.....	26
3.8.3	Kanada	26
3.8.4	Juhoafrická republika	27
3.8.5	Austrália	27
4	Komentár	28
5	Záver	29
6	Súhrn.....	31
7	Resume	32
8	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....	33
9	ZOZNAM OBRÁZKOV, TABULIEK A GRAFOV	39

1 ÚVOD

Víno sa v ľudskej kultúre nachádza už od nepamäti. Tak ako ľudstvo aj ono samé prechádzalo vývojom. Od náhodne sfermentovanej hroznovej šťavy cez stredoveké pivnice až po dnešné moderné vinárstvo. Aj napriek tomu, že prichádza k technickému pokroku a zavádzaniu nových výrobných metód princíp zostáva stále rovnaký a s problémami, s ktorými sa potykali dávni vinári sa mnoho krát stretávajú i tí súčasní aj napriek všetkej vynaloženej snahe a využívaniu moderných poznatkov.

Počas výroby víno prechádza mnohými fázami a je vystavené množstvu faktorov, ktoré môžu ovplyvniť kvalitu finálneho produktu - počínajúc postupmi ošetrovania vinice, podmienkami zberu, pivničným hospodárstvom, vekom sudov, v ktorých víno dozrieva a nakoniec aj stáčaním vína a jeho uskladnením. Počas celého tohto procesu je víno sprevádzané odvekými spolupútnikmi - mikroorganizmami. Tieto mikroorganizmy môžu na víno pôsobiť pozitívne a byť žiaduce ako je to v prípade *Sacharomyces cerevisiae* či *Oenococcus oeni* alebo mnohokrát negatívne tak ako nežiaduce kvasinky *Brettanomyces*, ktorým je celá bakalárska práca venovaná.

Červené vína postihnuté týmito kvasinkami a ich metabolickými produktmi, sú v našich končinách považované za vína s vážnou chorobou. Aj napriek tomuto všeobecnému názoru sa ale nájdu zákazníci, ktorí tieto vína vyhľadávajú a dokonca aj vinárstva takéto vína zámerne vyrábajúce. Častokrát sú predávané za vyššie ceny ako šarže bez tejto anomálie, nakoľko sa jedná o niečo špeciálne a bežným konzumentom nepoznané. Naskytá sa otázka či tieto vína naďalej považovať za druhoradé alebo prezentovať ich postih ako prednosť a ďalej s ním pracovať. O tomto však rozhodne pravdepodobne koncový spotrebiteľ svojimi preferenciami.

2 CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce je preštudovať dostupnú literatúru a bližšie priblížiť problematiku *Brettanomyces bruxellensis* a animálnych tónov v technológii výroby vína. Popísať príčiny, pôvodcu a aspekty vplývajúce na tvorbu prchavých fenolov, spôsoby ich detekcie a prípadnej prevencie. Ďalej zmapovať touto problematikou vo väčšej miere zasiahnuté svetové oblasti a navrhnúť prípadne riešenia.

3 LITERÁRNA ČASŤ

V prvej časti sa zaoberáme teoretickými východiskami, ktoré budú predstavovať základ pre formulovanie výsledkov práce.

3.1 História

Kvasinky ľudstvo využíva minimálne od dôb neolitu. O tomto fakte svedčia chemické a mikrobiologické analýzy vykonané na keramike zo starovekej Číny a oblastí dnešného Gruzínska a Iránu, kde boli nápoje vyrobené kvasením známe najmenej 7000 rokov pred našim letopočtom. (ELLSWORTH, 2012)

Prvým, ktorý pozoroval jednotlivé kvasinky pomocou na našu dobu primitívnym mikroskopom bol Antoni van Leeuwenhoek, o čom svedčí jeho správa Kráľovskej spoločnosti v Londýne.

Aj napriek veľkej pozornosti venovanej problematike kvasiniek a kvasenia sa o pre túto prácu zaujímavých *Brettanomyces bruxellensis/dekkera* dozvedáme až v roku 1904 v spojitosti s výrobou piva v Anglicku, od čoho je odvodený aj názov *Brettanomyces* ako „British brewing fungus“. V súvislosti s vínom sa s týmito kvasinkami stretáme v roku 1930 vo francúzskych vinárstvach a ich vínach. Ako C. Curtin uvádza vo svojom článku *Brettanomyces bruxellensis* a ich najbližší príbuzný *Brettanomyces anomalus* boli v rozmedzí rokov 1964 až 1984 zaradení do synonymného rodu *Dekkera* (ako *D.bruxellensis* a *D.anomala*) na základe pozorovania, že niektoré izolované kultúry sporujú. Vďaka tomuto zisteniu sa vedecká obec rozhodla upustiť od ich ďalšieho rozlišovania a začalo sa používať jednotne pomenovanie *Brettanomyces*. Prvý pokus o určenie genómu bol v roku 2007 avšak úspešné sa podarilo identifikovať celú sekvenciu až v roku 2012. (CURTIN a kol., 2015; SCHIFFERDECKER a kol., 2014)

3.2 Pôvodca

3.2.1 Kvasinky *Brettanomyces*

Brettanomyces patria do ríše Fungi, triedy Saccharomycetes a radu Saccharomycetales. Ako bolo už vyššie v práci spomenuté kvasinky *Brettanomyces/Dekkera* existujú v dvoch formách a to podľa toho akým spôsobom sa rozmnožujú. Označenie *Dekkera* sa používa pokiaľ sa kvasinka rozmnožuje pohlavne a sporuluje (telomorfa) zatiaľ čo označenie *Brettanomyces* používame v prípade keď sa kvasinka množí nepohlavne, nesporuluje a jedná sa o jej anamorfu. Na rozdiel od piatich druhov *Brettanomyces*, pod označenie *Dekkera* radíme iba dva a to *Dekkera bruxellensis* a *Dekkera anomalus*. (MARTYNIÁK a kol., 2016) Nakoľko je svetovo rozšírenejší a vo vinárskom svete zaužívanější názov *Brettanomyces* a „Brett tony” budeme ďalej v práci používať len tento názov.

Vegetatívna forma *Brettanomyces* má oválny vzhľad mnohostranne pučiacich pseudohyf väčšinou špicato zakončených na jednej strane. Pseudohyfálna štruktúra je výsledkom bunecnej reprodukcie a môže byť rozdelená do piatich rozdielnych kategórii. (MARTYNIÁK a kol.,2016)



Obrázok 1: Kvasinka *Brettanomyces Bruxellensis* (Schifferdecker a kol., 2014)

Brettanomyces nie sú náročné na výživu a postačuje im aj veľmi nízka koncentrácia cukrov. Dokážu sa adaptovať na tvrdé a obmedzujúce podmienky okolitého prostredia, ako je vysoká koncentrácia etanolu, nízka hodnota pH a zlé zdroje dusíka. Uprednostňujú príjem dusíka v amónnej forme avšak dokážu využiť aj ionty dusičnanov. Vzhľadom na tieto aspekty dokážu prežiť obdobie etanolovej fermentácie v mušte na rozdiel od ostatných divokých kvasiniek. Optimálne teplotné podmienky pre rast majú medzi 19°C až 35°C, pri teplotách 37°C až 42°C bol zaznamenaný variabilný rast a teplota 45°C je ich teplotný vrchol, pri ktorom už nedokážu ďalej rásť. (SCHIFFERDECKER a kol., 2014)

3.3 Zdroje infekcie

V minulosti bola za hlavný zdroj infekcie považovaná nedostatočná hygiena v jednotlivých vinárskych prevádzkach, avšak aj napriek tomu, že postupom času sa kládol čoraz väčší dôraz na sanitáciu a zvýšenie hygienických štandardov pri spracovaní hrozna tento problém pretrvával. Zistenie viedlo k teórii, že ku kontaminácií musí prichádzať ešte skôr ako v mušte. Dôsledkom toho bol zahájený rozsiahly výskum príčin a podmienok infekcie. (RENOUF a kol., 2006). Zdrojov napadnutia môže byť mnoho, preto uvádzame najbežnejšie z nich.

Kontaminácia vo vinici

Bez ohľadu na vyspelosť dnešných technológií zostáva identifikácia a izolácia vzoriek *B. bruxelensis* z kerov a bobúľ revy veľmi náročnou, nakoľko na bobuliach je veľká diverzita mikroorganizmov a na ich koncentráciu vplýva množstvo vonkajších podmienok ako je: neschopnosť dominancie, poveternostné podmienky ale aj chemická ochrana zo strany vinohradníka. Bolo preukázane, že je priama súvislosť medzi výskytom kvasiniek *Brettanomyces* na hroznách a napadnutím suroviny octovou hnilobou. Z toho vyplýva, že na výskyt *Brettanomyces* sú náchylnejšie vína vyrobené z poškodených alebo inak nezdravých hrozi. (ČERNOHORSKÁ, 2012)

Nedostatočná hygiena vo vinárstve

B. bruxellensis je väčšinou izolovaná z vína ale je dobre prispôsobená aj na život mimo neho. Bola kultivovaná na všetkých povrchoch vo vinárstve ako: steny, lisy, fermentačné nádoby, čerpadlá. Tieto povrchy a prostredie sú pre *B. bruxellensis* vhodnými miestami pre jej množenie kým v mušte prebieha fermentácia avšak najideálnejšie pri zrení vína. Na dôvažok schopnosť *B. bruxellensis* tvoriť biofilm robí dezinfekciu značne náročnou, keďže biofilm je relatívne rezistentný k čistiacim a sanitačným prostriedkom. (SMITH a DIVOL., 2016)

Využívanie použitých sudov

Použitie dubových sudov a dreva je v tejto dobe bežnou praxou pri kvasení a vyzrievaní vín vyššej kvality avšak okrem pozitívnych vplyvov na jeho chuť a vôňu, ktoré víno získava z extraktívnych látok obsiahnutých v sudoch sa tento proces spája aj so značným rizikom infekcie. (RUBIO a kol., 2015)

Ako sme sa už vyššie zmieňovali, pre *B. bruxellensis* je ideálnym obdobím pre množenie a život obdobie kedy je alkoholová fermentácia ukončená a konkurenčné mikroorganizmy potlačené vďaka vysokému obsahu alkoholu a nedostatku živín. Tieto podmienky dokonale spĺňajú práve drevené, zväčša dubové barrique sudy, v ktorých víno dozrieva. K najväčšej kontaminácii *B. bruxellensis* prichádza pri využívaní a kupovaní nových alebo použitých sudov z iných vinárstiev, ktoré sú kontaminované touto kvasinkou. Vďaka schopnosti *B. bruxellensis* využitia celulózy a iných substrátov podobného zloženia je náročné kvasinky z takéhoto sudu odstrániť akonáhle sa v ňom raz vyskytnú. (SMITH a DIVOL. 2016)

Pri práci so surovinou

Ďalšou z ciest, ktorou sa môže víno infikovať sú samotné enologické postupy. Jedným z nich je aj nakvášanie rmutu, pri ktorom je samotný mušt v dlhšom kontakte so šupkami bobulí. Z tohto dôvodu sú na infekciu náchylnejšie najmä červené vína, ktoré ležia na šupkách niekoľko týždňov a v prípade oranžových vín mesiace.

V tejto fáze výroby vína prichádza všeobecne k exponenciálnemu rastu množstva mikroorganizmov, medzi ktorými nie sú si schopné *B. bruxellensis* vy dobyť dominantnú pozíciu na rozdiel od *Saccharomyces cerevisiae*. Dokážu sa však na toto prostredie adaptovať a vyčkávať na vhodnejší čas pre ich rozvoj. Týmto obdobím je obdobie malolaktickej fermentácie, počas ktorého je značne znížený obsah antimikrobiálne pôsobiaceho voľného SO₂. V tejto fáze taktiež prichádza k rozkladu ostatných kvasiniek a využitiu ich tiel baktériami MLF. (RENOUF a kol., 2005; WEDRAL a kol., 2010)

3.4 Tvorba prchavých fenolov

Po mnoho rokov bol vznik etylfenolov považovaný za produkt metabolizmu mliečnych baktérií. Avšak nikdy nebolo možné dokázať spojitosť medzi prítomnosťou etylfenolov po dokončení malolaktickej fermentácie alebo vo vinách skladovaných za prítomnosti kalov obsahujúcich MLF baktérie. Po izolovaní octových baktérií, mliečnych baktérií a ostatných druhov kvasiniek z červených vín s fenolickým zápachom bolo demonštrované, že kvasinky *Brettanomyces* sú jediné mikroorganizmy schopné tvoriť etylfenoly v množstvách až niekoľkých miligramov na liter (RIBÉREAU-GAYON a kol., 2006).

Senzorický prah pre etylfenoly je veľmi nízky. Už od 350 do 1000 μg L⁻¹ dokážu ovplyvniť aromatickú kvalitu vín, v lepšom prípade dodávajú vínam korenistú a dymovú arómu. Avšak vo vyšších množstvách, sa takéto vína označujú ako fenolické, animálne, so zápachom konského sedla alebo s vôňou sedliackeho dvora. Koncentrácia prchavých fenolov je priamo úmerná veľkosti populácie *B. bruxellensis*. Hlavnými aromatickými zložkami stojacimi za týmito vadami sú prchavé fenoly ako 4-ethylphenol a 4-ethylguaciol. (BENITO a kol., 2009; TCHOBANOV a kol., 2008)

3.4.1 Hydroxyškoricové kyseliny ako prekurzory

Hydroxyškoricové kyseliny sú sekundárnymi metabolitmi odvodenými od fenyľalanínu, Sú široko rozšírené v rastlinných druhoch, ktoré sa využívajú ako priama potrava alebo sú používané na výrobu nápojov, najmä ak sú prítomne vo vysokých koncentráciách v ovocí, zelenine, čaji, kakau a pre nás zaujímavom víne.

Vyskytujú sa ako voľne karboxylové kyseliny, amidy alebo estery, vytvorené kondenzáciou s hydroxylovými kyselinami, flavanoidmi alebo sacharidmi. Majú 3-6 uhlíkatú kostru a patria do jednej z najdôležitejších skupín fenolových kyselín, ktoré boli zistené ako v hroznách tak aj vo vinách.

Najnovšie výskumy naznačujú, že pozitívne vplývajú na zachovanie kvality vín a to najmä pri posilnení a stabilizácii farby a taktiež im je prisudzovaná schopnosť pôsobiť ako dobré kopigmenty s antokynami. Tieto hydroxyškoricové kyseliny sú kvasinky *B. bruxellensis* schopné enzymaticky pretvoriť na prchavé fenoly, takže sú považované za ich prekurzory. (CALVENZANI a kol., 2015; ZHANG a kol., 2015)

3.4.2 Hydroxyškoricové kyseliny v hrozne a mušte

Hydroxyškoricové kyseliny sa v bobuliach vyskytujú prirodzene. V bobuliach sú bezfarebné avšak pri kontakte so vzduchom prichádza k ich oxidácií, čoho následkom začínajú žltnúť až hnednúť. Tento jav môže spôsobovať nahnedlé tóny v bielych vínach podliehajúcich oxidácii. Základné hydroxyškoricové kyseliny vyskytujúce sa v mušte a víne sú tri, ale na tvorbe prchavých fenolov sa podieľajú len dve z nich a to kyselina p-kumarova, ktorá stojí za tvorbou 4-vinyl a 4-etylphenolou a kyselina ferulová zodpovedná za vznik 4-vinyl a 4-etylguajacolov (KUMŠTA, 2007).

Hydroxyškoricové kyseliny sú jedinými fenolickými látkami nachádzajúcimi sa v dužine bobulí. Z dužiny prechádzajú do muštu, kde má na ich množstvo vplyv odroda, vyzretosť hrozna, teplota stanoviška.

3.4.3 Vplyv spracovania

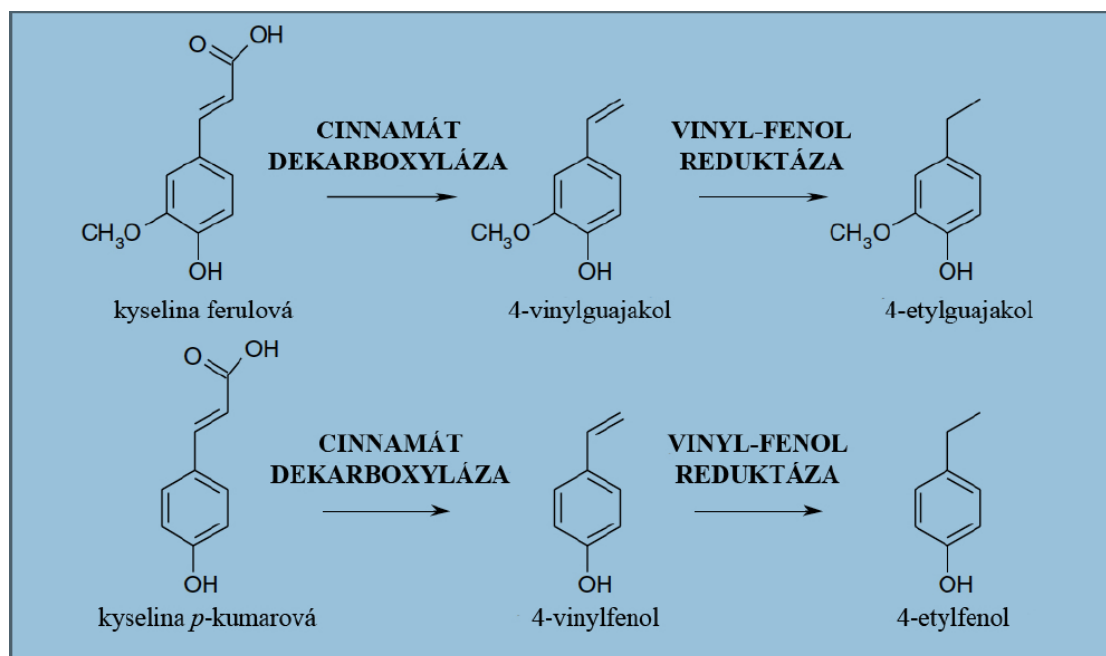
Prídavky enzýmov, termovinifikácia, mikrooxidácia alebo teplota fermentácie môže taktiež ovplyvňovať obsah voľných hydroxyškoricových kyselín vo víne. Na zvýšenie obsahu týchto kyselín vo víne môže mať vplyv tiež malolaktická fermentácia a ležania na kvasniciach a to vďaka rozpadu vinných esterov. (PAVLOUŠEK, 2011)

3.4.4 Transformácia prchavých fenolov

Za pôsobenia enzýmov sa zmieňované voľne formy neoxidatívnu dekarboxyláciu menia na vinylfenoly a až na konci reakcie je enzymatická redukcia vinylfenolov na etylfenoly, ktoré dodávajú vínu charakteristickú organoleptickú povahu, pri ktorej môžeme tvrdiť že je závislá od aktivity kvasiniek *Brettanomyces* alebo baktérii. (EDER, 2006; OELOFSE, 2008; HARRIS, 2011)

3.4.5 Enzymatická premena

Za pôvodom prchavých fenolov stojí pôsobenie dvoch enzýmov na hydroxyškoricové kyseliny (ferulovú, p-kumarovu prípadne kyselinu kávovú), ktoré sú známe ich antimikrobiálnymi vlastnosťami. Bolo dokázané, že mikroorganizmy stojace za fermentáciou rastlinných produktov ako *B. bruxellensis*, majú enzýmy schopné tieto látky rýchlo rozložiť na menej toxické zlúčeniny.



Obrázok 2: Tvorba etylfenolov z ich prekurzorov- hydroxyškoricových kyselín (Suárez a kol., 2006)

Hydroxycinamát dekarboxyláza v prvom kroku premení kyseliny p-kumarovú, ferulovú a kávovú na hydroxystyrény (vinylfenoly) konkrétne 4-vinylfenol, 4-vinylguajacol a 4-vinylcatechol.

V druhom kroku prichádza k redukcii týchto vinylfenolov enzýmom vinylfenol reductáza na nežiaduce prchavé etylfenoly: 4-etylfenol, 4-etylguaiacol a 4-etylcatechol. (Obr. 2) (LAFORGUE, R. a A. LONVAUD-FUNEL, 2012)

3.4.6 Ostatné mikroorganizmy tvoriace prchavé fenoly

Enzým uskutočňujúci dekarboxyláciu sa vyskytuje u veľkého množstva mikroorganizmov ako napríklad *Sacharomyces cerevisiae*, *Pichia spp.*, *Torulaspóra spp.* alebo mnohých druhov baktérii mliečneho kvasenia, ale následnú redukcii dokáže vykonávať len niekoľko druhov, medzi ktoré patria *B. Bruxellensis*, *B. anomala*, *P. guillermondii*, *C. versatilis*, *C. halophila* a *C. mannitofaciens*.

Tieto kmene sú schopné vytvoriť značné množstvo vinylfenolov, avšak vo vinárstve sa jedná o opomenuteľné množstvo. Taktiež odlišné kmene *Brettanomyces* môžu produkovať rôzne množstvá prchavých fenolov (SUÁREZ a kol., 2007)

3.4.7 Ďalšie produkty *Brettanomyces*

Myšina

Myšina nie je tak častou ale zato nepríjemnou chorobou vína. Ako už názov nasvedčuje jedná sa o chorobu prejavujúcu sa chuťou po myšacích výkaloch alebo dlho nevetraných priestoroch. Zasahuje najmä do chuti, vo vône ju je cítiť len pri veľmi vysokých koncentráciách. Spôsobená je heterocyklickými dusíkatými zlúčeninami, konkrétne: 2-acetyltetrahydropyridín (ATHP), 2-etyl-tetrahydropyridín (ETHP) a 2-acetylpyrollín (APY).

Tieto látky sú produkované octovými a mliečnymi baktériami, ale aj kvasinkami *Brettanomyces*. Často chorobu nachádzame vo vínach s nízkym obsahom kyselín a vysokým pH. Dosiaľ nie je úplne preskúmané čo myšinu spôsobuje, avšak bolo zistené, že látky spôsobujúce túto chorobu vznikajú až počas alkoholovej fermentácie a nenachádzajú sa už v mušte. (ROMANO a kol., 2008; KRAUS a kol., 2010)

Prchavé mastné kyseliny

Veľmi významnou skupinou látok produkovaných *Brettanomyces* sú prchavé mastné kyseliny. Medzi ne patria najmä: kyselina isovalérová, 2-methylbutyrová a taktiež isomáselná. Kyselina isovalerová je veľmi výrazná a preto má značný senzorický dopad na víno. Jej aromatický profil sa označuje ako zožltnutý alebo skazený. Veľmi často sa nachádza vo vínach označovaných ako vína s „Brett“ charakterom. Považuje sa za zosilňujúci aspekt vnímania nežiaducich látok, ako sú napríklad prchavé fenoly. (KUPSA a kol., 2011)

Octová kyselina

Druh *Brettanomyces* je dobre známy svojou citlivosťou na prístup kyslíka a tvorbou kyseliny octovej. Custer (1940) zistil, že bunky *Brettanomyces* v pokojnom štádiu za prístupu kyslíka fermentovali glukózu omnoho vyššou rýchlosťou ako počas jeho absencie. Jav bol podľa svojho objaviteľa neskôr pomenovaný ako „Custerov efekt“ a je opakom Pasteurovho efektu. Tento efekt sa spája s inhibíciou alkoholovej fermentácie za anaeróbných podmienok a silnou tendenciou *Brettanomyces* vyrábať z glukózy kyselinu octovú s paralelnou redukciou NAD⁺.

Z týchto zistení vyplýva, že prístup kyslíka pozitívne vplýva na množenie a rast *Brettanomyces* počas výroby vína. Predpokladá sa, že anaeróbne podmienky počas fermentácie dokážu aspoň čiastočne spomaliť ich rast. (CASTRO-MARTINEZ a kol., 2005)

Biogénne amíny

Mnoho mikroorganizmov vďaka svojej metabolickej aktivite dokáže tvoriť biogénne amíny. Tieto produkty vznikajú dekarboxyláciou aminokyselín, napríklad z histidínu môže vzniknúť histamín. CARUSO a kol. (2002) skúmali tvorbu biogénnych amínov rôznymi druhmi kvasiniek nachádzajúcimi sa vo víne vrátane *B. bruxellensis*. Pri tomto výskume prišli k zisteniu, že *Brettanomyces* sa vyznačujú najvyššou produkciou biogénnych amínov (v priemere 15mg.l⁻¹) medzi všetkými skúmanými kvasinkami. Medzi produkované amíny

patrili najmä etanolamín, metylamín, tryptamín, putrescín, kadaverín, histamín, agamatín a 2-fenyletylamin.

Biogénne amíny spôsobujú problémy hlavne ľuďom s neznášanlivosťou histamínu. Nežiaduce účinky sa prejavujú ako bolesť hlavy, hnačka, kožné vyrážky, nevoľnosť a iné. (OELOFSE a kol., 2008)

3.4.8 Ďalšie vplyvy na kvalitu vína

Brettanomyces taktiež dokážu hydrolyzovať anthokyany, destabilizovať aglycon, spôsobovať zákaly, uvoľňovať glukózu a metabolizovať ďalšie látky znehodnocujúce víno. (RIBÉREAU-GAYON, 2006)

3.4.9 Podmienky pre vznik a rozvoj infekcie

Víno a obzvlášť suché červené víno je na živiny chudobné rastové médium s mnohými limitujúcimi faktormi ako pre kvasinky tak aj pre baktérie. Tieto podmienky sú výsledkom kombinácie mnohých faktorov, napríklad: počiatočné chemické zloženie hroznovej šťavy, alkoholické a jablčno-mliečne kvasenie a najmä intervencie od samotných vinárov. Jedná sa konkrétne o nepatrné množstvá cukru a asimilovateľných dusíkatých zlúčenín, ktoré sú k dispozícii po primárnej alkoholovej a malolaktickej fermentácii, pretože väčšina z nich bola využitá *Saccharomyces cerevisiae* a *Oenococcus oeni*. Okrem toho, teploty vo vinárskych pivniciach majú tendenciu byť nízke a pohybujú sa medzi 9 až 20 ° C v priebehu výroby a skladovania vína.

Aj napriek tomuto *B. bruxellensis* oplývajú veľkou adaptačnou schopnosťou aj na takto nehostinne prostredie. Medzi ich prednosti patrí napríklad aj schopnosť rozkladať a využívať pentózy (arabínosu, rhamnosu, ribosu a xylosu) teda cukry, ktoré zostávajú vo víne po fermentácii *Saccharomyces cerevisiae*. Ako zdroje dusíka väčšinou využívajú uvoľnené dusíkaté látky z autolýzy týchto kvasiniek. (SMITH a DIVOL. 2016)

B. bruxellensis sú do istej miery rezistentné voči SO₂, nižšiemu obsahu kyslíka, vyššiemu obsahu alkoholu. Bolo zistené, že k ich rastu často prichádza i počas zrenia vína aj napriek využitiu bežných enologických metód prispievajúcich k mikrobiálnej stabilite

vína, ako čírenie, stáčanie z kalov a často využívané pridávanie SO₂. (COULON a kol., 2009)

Na rast a vývoj kvasiniek má vplyv aj teplota, ktorá je pre *Brettanomyces* optimálna okolo 18°C. Ďalším z faktorov, je menej dôležitá hodnota pH a niektoré výskumy poukazujú aj na acidotolerantnosť týchto kvasiniek. (BENITO a kol., 2009, SCHIFFERDECKER a kol., 2014) Pozitívny vplyv na rast populácie kvasiniek môže mať vyšší obsah thiaminu (vitamín B1) pridaný vo forme výživy pri výrobe vína. (STEIDL a kol., 2002)

Tolerancia voči alkoholu je u jednotlivých kmeňov *Brettanomyces* rozdielna. Aj napriek tomu možno povedať, že schopnosť produkcie prchavých fenolov je signifikantne vyššia a častejšia pri obsahu alkoholu pod 15%. Avšak niektoré kmene boli izolované z vín s vyšším obsahom alkoholu a to konkrétne zo sherry. Z tohto vyplýva, že okrem ojedinelých prípadov je vyšší obsah alkoholu pre kvasinky limitujúci a inhibuje ich životné pochody. (SUÁREZ a kol., 2007, OELOFSE a kol., 2008)

3.5 Senzorické prejavy

Prítomnosť *Brettanomyces* sa väčšinou spozná podľa dvoch prchavých fenolov. Ide o 4-etylfenolu a 4-etylguaiakolu, isovalerovej (3-metylbutyrovej) kyseliny a rôznych tetrahydropyridinov. V jednom z výskumov COULTER a kol. (2004) zistili, že 4-etylfenol a 4-etylguaiakol (obe spojované s vôňami konského sedla, sedliackeho dvoru alebo lekárenskými tónmi) boli hlavnými zlúčeninami stojacimi za nežiaducimi vôňami v červených vínach.

Taktiež zistili, že koncentrácia isovalerovej kyseliny (prejavujúcej sa ako syrová, spotená, zatuchnutá vôňa) nie je závislá na koncentrácii dvoch vyššie spomínaných zlúčenín. Preto sa uvažuje, že kyselina isovalerová sa môže podieľať na ďalších senzorických prejavoch s ostatnými metabolickými produktmi *Brettanomyces* a má schopnosť zosilňovať ich vnímanie. Štúdia navyše dospela k záveru, že miera „postihnutia“ 4-etylfenolmi závisí na štýle a štruktúre konkrétneho vína. To znamená, že koncentrácia a intenzita iných zlúčenín nachádzajúcich sa vo víne dokážu túto vadu maskovať ako je to v prípade prchavých vonných zložiek z dubového sudu či chipsov, alebo naopak zosilňovať

ak sa vo víne dajme tomu nachádza 4-etylphenolom súbežne s 4-ethylguaiakolom. Napríklad v červenom víne s ľahkým telom a jemnými tónmi po dube môže byť sensorický prah pre 4-etylphenol už pri $350\mu\text{g l}^{-1}$ zato v komplexnom červenom víne s plným telom, ovocnou chuťou a plne vyextrahovanými dubovou arómou až pri $1000\mu\text{g l}^{-1}$. (DU TOIT a kol., 2005)

Všeobecne sa ale uvádza, že sensorický prah pre 4-ethylguaiakol je $0,072\text{ mg.l}^{-1}$ a pre 4-etylphenol $0,4\text{ mg.l}^{-1}$. (EDER, 2006) Ako už bolo povedané, celkovo sa tieto vône a chute označujú ako živočíšne alebo „animálne“ a sú oficiálne zaradené do Zoznamu odchýlok, chorôb a chýb vína v Komisii inšpekcie. Tento zoznam pochádza z Organizačného a rokovacieho poriadku Komisie štátnej poľnohospodárskej a potravinárskej inšpekcie pre hodnotenie a zatriedovanie vín zo dňa 10.7.2015. (www.szpi.cz, 2015)

Tab. 1: Sensorické prejavy animálnych tónov (STEIDL, 2002; EDER, 2006)

Senzorické prejavy animálnych tónov v červenom víne	
Chuť	po údenom mäse, špekáčikovo živočíšna, tóny pripomínajúce lekáraň, decht alebo plast
Vôňa	ostro sladká, po pote, spotenom konskom sedle, kožená, dechtová, pripomínajúca sedliacky dvor, plastová, lekárnický

3.6 Riešenie problematiky a prípadná ochrana

Animálne tóny sú bežným problémom mnohých vinárstiev vyrábajúcich červené vína a počas svojej praxe sa s nimi stretne väčšina vinárov. Nakoľko dosiaľ nebol vynájdený účinný nástroj alebo postup schopný odstrániť túto chybu z hotového vína bez negatívneho efektu na kvalitu vína, je o to dôležitejšie klásť dôraz na prevenciu počas celej doby výroby vína.

3.6.1 Hygiena

Tak ako v každom podniku, kde sa pracuje s potravinami alebo nápojmi je dôkladná hygiena najdôležitejším faktorom zabraňujúcim kontaminácii a znehodnoteniu produktu. Toto pravidlo platí pri obavách z kontaminácie *Brettanomyces* dvojnásobné. Na sterilné

a hygienické podmienky treba dbať od zberu hrozna až po fľaškovanie hotového vína. Čistenie a dezinfekcia všetkého zariadenia stretávajúceho sa s produktom by mala byť samozrejmosť.

3.6.2 Fyzikálne a mechanické metódy

Tieto metódy sa považujú za jedny z bezpečnejších, nakoľko pri nich nedochádza k uvoľňovaniu ďalších chemických látok do produktu. Samozrejme, každý zásah do vína má svoje pozitíva a negatíva a to platí aj o fyzikálnych a mechanických metódach.

Filtrácia

Účelom filtrácie je odstrániť pevné častice a látky spôsobujúce zákal nachádzajúce sa vo víne bez ovplyvnenia jeho kvality. Ich účinnosť sa líši podľa typu filtra a veľkosti pórov použitého filtračného materiálu.

Brettanomyces vďaka svojej veľkosti dokážu prechádzať bežným 0,45 µm filtrami využívaným na odfiltrovanie kvasiniek a tým pádom predstavujú problém u vín zrejúcich vo fľašiach. Ich úplné odstránenie je možné dosiahnuť sterilnou cross-flow filtráciou s pórmi, ktoré majú veľkosť 0,22 µm. Tento druh filtrácie je ale nutné zvážiť, nakoľko sa pri nej jedná o značný zásah do vína. (KUMŠTA, 2007; EDER a kol., 2006; COULON a kol., 2010)

Pulzné elektrické pole (PEF)

Metóda je založená na sterilizácii vína bez nutnosti jeho zohrievania. Využíva elektrické pole o sile 10-50 kV/cm aplikované v pulzoch trvajúcich 1-30 ms, medzi elektródami obvykle vzdialenými 3-5 mm. Celková doba ošetrovania je kratšia ako 1 sekunda a preto by nemalo prichádzať k zmenám kvality vína. Pri vhodnom použití prichádza k eliminácii až 99,9% mikroflóry, ktorá spôsobuje znehodnotenie muštu a vína ako napríklad *Brettanomyces sp.* alebo *Laktobacillus sp.* (www.agronavigator.cz, 2004)

Ultrafialové žiarenie (UV)

Jedná sa o elektromagnetické žiarenie s vlnovou dĺžkou od 10 nm do 380 nm, ktoré je kratšie ako viditeľné svetlo, ale dlhšie ako mäkké röntgenové žiarenie.

O využití tohto žiarenia sa uvažuje ako o metóde, ktorá by nemala vo väčšej miere ovplyvňovať senzorické vlastnosti. Je s ním už niekoľko rokov experimentované za účelom zníženia koncentrácie SO₂ počas výroby vína. (BAROŇ, 2013) Metóda zaznamenala úspechy voči celej rade mikroorganizmov, ktoré sa nachádzajú vo víne vrátane *Brettanomyces*.

3.6.3 Chemické metódy

Tieto metódy sú väčšinou finančne a technicky menej náročné avšak je pri nich zvýšené riziko zmeny charakteru a zdravotnej bezpečnosti vína.

Dimethylkarbonat (DMDC)

Toto potravinové aditívum má silný antimikrobiálny efekt a maximálny inhibičný účinok glykolytických enzýmov nastáva krátko po jeho pridaní. Jeho veľkou výhodou je malá závislosť na pH. V roku 2007 prebehol vo Francúzsku výskum zaoberajúci sa antimikrobiálnymi účinkami dimethylkarbonatu (DMDC) na víno napadnuté kvasinkami *Brettanomyces bruxellensis* v rôznych štádiách výroby vína. Jedným z výsledkov výskumu bolo zistenie, že DMDC pôsobí aj na iné mikroorganizmy ako napríklad *Sacharomyces cerevisiae* a *Oenococcus oeni* a preto by sa nemal používať pred koncom fermentácie, nakoľko by mohlo prísť k jej neplánovanému spomaleniu až zastaveniu. Preto je jeho použitie vhodnejšie pred fľaškováním vína (RENOUF a kol., 2008; BAROŇ, 2013). Bolo taktiež zistené, že len jedna aplikácia nestačí a je lepšie ju opakovať.

Na základe podobného výskumu, ktorý prebehol na Ústave vinohradníctva a vinárstva Záhradníckej fakulty Mendelovej univerzity v Brne, bolo zistené, že na potlačenie *B. bruxellensis* je dostačujúca koncentrácia 150 mg.l⁻¹ a u *Sacharomyces cerevisiae* až o 100 mg.l⁻¹ vyššia. (BAROŇ, 2013)

Sírenie

Prídavok oxidu siričitého má viacero účinkov:

- potlačenie oxidačných enzýmov
- potlačenie nežiaducich kvasiniek a baktérií
- vyviazanie vzdušného kyslíka
- zvýšenie vyluhovateľnosti trieslovín

Čím skôr je oxid siričitý dodaný, tým lepšie je možné rmut chrániť pred mikrobiálnou infekciou, účinkami vzduchu a podporiť rozvoj buketu a čistoty charakteru. Potlačí sa množenie baktérií a nežiaducich kvasiniek citlivých na oxid siričitý a tým sa vykoná ich predbežná selekcia. Účinok sírenia sa naplno prejaví najmä pri koncentrácii 50 mg.l^{-1} . Pri vínach s vyšším pH sa odporúča vyššia koncentrácia, ale takéto prídavky môžu negatívne ovplyvniť kvalitu vína.

Pri kvasinkách *Brettanomyces bruxellensis* sa považuje minimálna koncentrácia SO_2 $0,625 \text{ mg.l}^{-1}$, avšak iné zdroje uvádzajú, že obsah oxidu siričitého nižší ako 25 mg.l^{-1} z mikrobiálneho pohľadu znamená „žiadne SO_2 “. (STEIDL a RENNER, 2004; EDER a kol., 2006; RENOUF a kol., 2007)

Vyššie mastné kyseliny

V biochémií sa týmto názvom označujú vyššie monokarboxylové kyseliny. Mastné kyseliny sa delia podľa rôznych kritérií, napríklad podľa dĺžky reťazca alebo nasýtenia. Vyššie mastné kyseliny s 16-18 uhlíkmi v reťazci sú potrebné pre aktiváciu kvasenia a sú teda pre mikroorganizmy potrebné, čo sa však nedá povedať o kyselinách, v ktorých reťazcoch sa nachádza len 8 až 10 uhlíkov.

Tieto kyseliny vykazujú fungicídny účinok a je ich možné využiť na zastavenie alkoholovej fermentácie. Jedná sa najmä o kyselinu oktánovú (kaprylovú) a kyselinu dekánovú (kaprinovú). Prídanie týchto kyselín do kvásiaceho muštu preukázateľne dokáže zastaviť rast nežiaducich kvasiniek. (CHÁBEROVÁ, 2016)

Cyklohexamid

Cyklohexamid je antibiotikum, ktoré sa používa ako prídavok do médií určených na selekciu mikroorganizmov. Uskutočnili sa viaceré výskumy zameriavajúce sa na účinok tejto látky na kmeň kvasiniek *Brettanomyces*. Bežná koncentrácia cyklohexamidu pre inhibíciu sa pohybuje v rozmedzí 10 až 100 mg.l⁻¹. Na základe rôznych špekulácií tvrdiacich, že niektoré kmene *Dekkera* môžu vykazovať väčšiu citlivosť bolo experimentálne zistené, že väčšina kvasiniek bola inhibovaná pri koncentrácii 50 mg.l⁻¹ ale kvasinky *Dekkera* boli stále prítomné v určitom menšom množstve. (MORNEAU a kol., 2011)

No Brett Inside

Ide o komerčný prípravok založený na prirodzenom polysacharide, ktorý bol izolovaný z chitínu (z huby *Aspergillus Niger*). Podľa výrobcu dokáže inaktivovať *Brettanomyces* vo víne a tým zabrániť tvorbe prchavých fenolov a iných produktov metabolizmu týchto kvasiniek. Toto tvrdenie sa opiera o vedecké štúdie a testy, ktoré potvrdzujú jeho účinnosť. Prípravok by mal efektívne zabrániť nežiaducej aróme a zároveň byť sensoricky neutrálny. Taktiež by jeho prednosťou mala byť ekologickosť, nakoľko po zapracovaní do pôdy ho začínajú rozkladať pôdne organizmy. Neboli dokázané alergické účinky a odporúčené dávkovanie je 4 g.hl⁻¹. (www.scottlab.com, 2014)

Esterifikovaná celulóza

Vo svete sa uskutočnilo viacero výskumov, ktoré zistili že jedným z ďalších spôsobov odstránenia „Brett charakteru“, konkrétne 4-etylfenolu a 4-etylguajakolu z červeného vína, je použitie vlákien esterifikovanej celulózy (acetát celulózy, CAP, CP). Táto metóda neovplyvňuje farbu vína ani obsah proanthokyanidínov alebo katechínov. (ČERNOHORSKÁ, 2012)

Toxin z *Ustilago maydis*

V roku 2010 prebehol pokus, pri ktorom bolo z vinárstiev izolovaných, identifikovaných a testovaných 39 kmeňov kvasiniek patriacich k *Sacharomyces cerevisiae*

a *B. bruxellensis* proti spektru 39 „smrťiacich“ kvasiniek. Pri tomto teste sa prvýkrát ukázalo, že *Ustilago maydis* CYC 1410 je účinná proti *B. Bruxellensis*. Zmiešané kultúry vo vinárskych podmienkach majú schopnosť inhibovať *B. Bruxellensis* zatiaľ čo *S. cerevisiae* je plne rezistentná voči tejto „smrťiacej“ aktivite, čo naznačuje že by bolo možné využívať tento toxín pri fermentácii vín s cieľom potlačiť *B. Bruxellensis* a to bez vedľajších účinkov na žiaduce kvasinky. (SANTOS a kol., 2011)

3.7 Metódy stanovenia animálnych tónov a kvasiniek *Brettanomyces*

3.7.1 VBNC stav

Zistenie prítomnosti tejto nežiaducej kvasinky je dnes možné pomocou veľkého množstva techník založených na kultivácii. Aj napriek tomuto faktoru nie vždy je táto metóda úspešná. Stáva sa, že vo vínach, ktoré boli označené pomocou týchto metód za nezávadné a bez prítomnosti kvasiniek *Brettanomyces* sa po nejakom období rádovo mesiacov alebo rokov začnú objavovať prchavé fenoly, ktoré sú nimi produkované.

Tento jav je možné vysvetliť schopnosťou kvasiniek vstúpiť do takzvaného VBNC (*viable but nonculturable*) stavu, životaschopného ale nekultivovateľného. Podľa niektorých štúdií sa uvažuje, že tento jav vyvoláva pôsobenie oxidu siričitého, ktorý núti prejsť *Brettanomyces* do tohto stavu. Po odznení spomínaného stresujúceho faktoru sú bunky schopné znovu obnoviť svoju normálnu aktivitu. Bunky sú v tomto stave menšie a k ich rastu už ďalej nedochádza ani po jeho skončení. Vo VBNC stave taktiež naďalej dokážu produkovať 4-etylphenol, avšak v menšom množstve a k tvorbe 4-etylguajakolu nedochádza vôbec. (SERPAGGI a kol., 2011)

3.7.2 Spôsoby identifikácie *Brettanomyces*

Nakoľko je identifikácia *Brettanomyces* v prostredí s výskytom väčšieho množstva iných mikroorganizmov pomerne náročná, boli vyvinuté rôzne postupy a metódy ich identifikácie.

Kultivácia na živnom médiu

Výhodou tejto metódy je jej nízka finančná a časová náročnosť. Zakladá sa na využívaní živných médií s rôznymi druhmi cukrov a elementárnych zložiek. V počiatku média pre kultiváciu *Brettanomyces* obsahovali ako zdroj uhlíka najmä maltózu a sacharózu. Neskôr, na základe novších štúdií bolo zistené, že je vhodnejšie využívať ako zdroj uhlíka trehalózu a sacharózu súčasne s rôznymi antimikrobiálnymi aditívami k potlačeniu rastu nežiaducich mikroorganizmov. (OLEOFSE, 2008).

Neskôr bolo Rodriguezom a kol. (2001) vyvinuté selektívne médium určené konkrétne na identifikáciu kvasiniek rodu *Brettanomyces*, s názvom *Dekkera/Brettanomyces Differential Medium* (DBDM). Okrem kvasinkového dusíkatého základu obsahovalo cyklohexamid, plniaci úlohu antimikrobiálneho činidla, alkohol, pH indikátor a kyselinu p-kumarovú. Na základe tejto práce Couto a kol. (2005) vyvinuli médium vychádzajúceho z WLN média (Wallerstein Laboratory Nutrient), ktoré malo potenciál byť využívané v každodennej vinárskej praxi. Avšak nevýhodou väčšiny týchto médií je, že vďaka pomalému rastu *Brettanomyces* môže inkubácia trvať až dva týždne. Taktiež ich schopnosť prechodu do VBNC (*viable but nonculturable*) stavu, ktorý sa vyznačuje tým, že v dôsledku pôsobenia SO₂ sa kvasinky vo víne naďalej nachádzajú a sú životaschopné ale nie sú kultivovateľné, môžu byť výsledky klasickej mikrobiálnej kultivácie falošne negatívne.

Metóda PCR

Polymerázová reťazová reakcia (PCR, z angl. polymerase chain reaction) je technika, ktorá umožňuje namnožiť určitý úsek molekuly DNA. PCR je v súčasnosti považovaná za jednu z najlepších a najpresnejších metód na identifikáciu kvasiniek *Brettanomyces* vo víne. Nevyhnutná je izolácia DNA, ktorá je pre tieto kvasinky špecifická pridaním enzýmu rozrušujúcim ich bunecnú stenu a umožní správne vyizolovanie.

PCR metóda detekcie kvasiniek rodu *Brettanomyces* prináša pri správnom postupe a výbere prímerov väčšinou dobrý výsledok. Najvhodnejšou metódou amplifikácie DNA je real-time PCR, vďaka ktorému je možné pozorovať hodnoty nárastu kvasiniek priebežne.

Základným predpokladom dobre vykonanej PCR reakcie je výber správnych prímérov. Pre kvasinky rodu *Brettanomyces* je navrhnutých niekoľko možných prímérov, ktoré sú špecifické pre tento rod. Táto vlastnosť so sebou prináša veľkú výhodu pri detekcii, pretože sa sústreďuje len na konkrétny rod a zámena s iným rodom kvasiniek nie je možná. Výsledok je z tohto dôvodu veľmi presný. (TESSONNIÈRE, 2009)

3.7.3 Senzorická analýza

Senzorické hodnotenie je subjektívnou metódou a jej kvalita závisí od viacerých faktorov počínajúc vekom, skúsenosťami, fyzickým a psychickým stavom hodnotiteľa končiac prostredím, teplotou, spôsobom podávania vzoriek atď.

Jeden z mnohých výskumov zaoberajúcich sa čuchovým vnímaním vínných odborníkov dokázal nezanedbateľné rozdiely v čuchovom vnímaní kľúčových zlúčenín vo víne vrátane etylfenolov. Tento výskum dokonca dokázal, že približne 1% zo 134 odborníkov podrobených testovaniu vykazuje hyposmiu na etylfenoly. Táto špecifická zmyslová porucha znižuje schopnosť detekovať a určiť túto chorobu v širokom aromatickom prostredí vína. Vyhodnotenie čuchového vnemu je založené na zistení, rozlíšení a identifikácii zmyslových podnetov. Ľudský čuch ma obmedzenú schopnosť rozpoznania a z tohto dôvodu je zložitejšie vybrať podstatnú informáciu z celkového súboru vnímaných pachov. Dobrým príkladom je obmedzená schopnosť odborníkov i nováčikov rozlišovať medzi zložkami zmesi najviac 3 až 4 zlúčeniny. Táto nevýhoda môže byť zmiernená niektorými fyziologickými a poznávacími faktormi ako napríklad čuchovým prispôbením. Taktiež tréningy senzorickí hodnotitelia majú väčšinou lepšiu schopnosť zaznamenať „Brett“ charakter vo víne už pri nižších koncentráciách. (TEMPÈRE a kol., 2014).

3.7.4 Stanovenie animálnych tónov pomocou GC- MS

Plynová chromatografia (GC) v spojení s hmotnostnou spektrometriou (MS) je v súčasnosti bežnou analytickou metódou, ktorá kombinuje vysokú separačnú schopnosť kapilárnej plynovej chromatografie s vysoko špecifickou detekciou pre daný analyt a zároveň umožňuje získanie informácie o štruktúre neznámych látok.

Principiálne každý hmotnostný spektrometer pracuje v troch v sérii zaradených etapách. Prvú z nich je možné chápať ako prevedenie študovanej látky do plynného stavu, druhá fáza je chápaná ako ionizácia vzniknutej plynnej fázy a záverečnou etapou je jej rozdelenie podľa hmotnosti iontov. (KÁČER a SYSLOVÁ, 1997)

Princípom plynovej chromatografie (GC) je oddeľovanie chemických látok na základe ich prchavosti a schopnosti premeny do plynného stavu. Zmes analyzovanej látky je vstreknutá do plynového chromatografu (GC), kde po vyhriati prichádza k jej odpareniu. Následne táto plynná zmes prechádza cez GC kolónu, kde je každá látka separovaná na základe jej interakcie. Ďalším bodom takto oddelených zlúčenín je cesta do hmotnostného spektrometra. Účelom tohto prístroju je identifikácia látok na základe ich štruktúry a skladá sa z: ionizátoru, iontového analyzátoru a detektoru. (www2.chemistry.msu.edu)

Dáta z týchto prístrojov sú v reálnom čase prevedené do počítača a zaznamenané do tzv. hmotnostného spektra. Správa z GC - MS obsahuje informácie z GC chromatogramu a taktiež z MS spektra. GC - MS prinášajú na základe retenčného času informácie o tom, koľko a akých zlúčenín (kvalitatívne) bolo zistených vo vzorke a kvantitatívne poskytujú správu o integrálnej ploche pík, ktoré boli nájdené v danej vzorke a predstavujú množstvo každej zlúčeniny obsiahnutej vo vzorke. (ČERNOHORSKÁ, 2012.)

3.8 Problematika animálnych tónov vo svete

S kvasinkami *Brettanomyces* a ich metabolickými produktmi sa potykajú takmer vo všetkých vinárskych oblastiach na svete. Bežne sa vyskytujú napríklad v Taliansku, Francúzsku, Nemecku, Španielsku, Austrálii, na Novom Zélande ale aj v Českej republike či na Slovensku. Avšak touto problematikou sa zaoberá a je zasiahnutých omnoho viac štátov.

3.8.1 Taliansko

V roku 2014 prebehol výskum na štyridsiatich ôsmich izolatoch *B. bruxellensis* získaných z červených vín pochádzajúcich z juhotalianskeho kraju Apulia, s cieľom zistenia ich genetickej variability a schopnosti tvoriť prchavé fenoly. Týmto výskumom bola zistená pozoruhodná genetická variabilita a potvrdila dôkazy o vysokej úrovni genotypového a fenotypového polymorfizmu. Taktiež bolo zistené, že *B. bruxellensis*

zozbierané z rôznych geografických oblastí majú rozdielnu schopnosť tvorby prchavých fenolov a tým pádom aj rozdielny potenciál na znehodnotenie vína. (DI TORO a kol., 2015)

V roku 2010 bolo osemdesiat sedem talianskych vín pochádzajúcich z krajov Liguria a Piedmont podrobených výskumu s cieľom zistenia prítomnosti *B. bruxellensis*. Pomocou bežných mikrobiologických identifikačných metód bolo zistené, že v 15% skúmaných vín z oblasti Liguria a v 8% vín z oblasti Piedmont sa tieto kvasinky nachádzajú. (CAMPOLONGO a kol., 2010)

3.8.2 Španielsko

Španielsko je ďalšou z krajín kde prebehol výskum ohľadne *Brettanomyces*. V roku 2010 bolo pomocou metódy RT-PCR skúmaných osemdesiat šesť vín produkovaných a predávaných v Španielsku. Táto metóda, bola zároveň porovnávaná s bežne používanou mikrobiologickou metódou počítania na selektívnom médiu. Pätnásť vzoriek (17,4%) bolo pozitívnych na prítomnosť *B. bruxellensis* pomocou počítania na médiu po 5-7 dňoch inkubácie a štrnásť (16,3%) ukázalo pozitívny výsledok pomocou RT-PCR analýzy už po siedmych hodinách. Z osemdesiatich šiestich testovaných vín bolo šestnásť (18,6%) pozitívnych aspoň na jednu z použitých metód. (PUIG a kol. 2011)

3.8.3 Kanada

V roku 2008 boli v Okanagan Valley nachádzajúcom sa v Britskej Kolumbii (Kanada) zisťované koncentrácie prchavých fenolov (4-etylphenolu a 4-etylguajakolu) v 188 vzorkách vína. Tieto vzorky pochádzali z desiatich komerčných vinárstiev a boli zozbierané v priebehu roku 2006. Taktiež všetky zreli v dubových sudoch. Pre účely tohto merania boli použité vína vyrobené z odrôd Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Syrah a Pinot noir a ich cuvée. Všetky namerané hodnoty sa pohybovali veľmi nízko pod prahom citlivosti na tieto látky. Jednalo sa konkrétne o hodnoty $56 \mu\text{g.l}^{-1}$ pre 4-etylphenol a $29 \mu\text{g.l}^{-1}$ pre 4-etylguajakol. Za príčinu takto nízkych nameraných koncentrácií sa považuje precízna hygiena, kvalitná starostlivosť o dubové sudy využívaním horúcej pary a oxidu siričitého vo všetkých vinárstvach, z ktorých vzorky pochádzali. (RAYNE a kol., 2008)

3.8.4 Juhoafrická republika

V roku 2008 bola v spolupráci s Inštitútom vinárskej biotechnológie v Stellenbosch v Juhoafrickej republike, vďaka zisteniu chýbajúceho bližšieho skúmania mikrobiológie vína, publikovaná dizertačná práca zaoberajúca sa rozvojom kvasiniek *Brettanomyces* počas produkcie vína. Táto práca bola súčasťou širšieho výskumu zaoberajúceho sa problematikou pri výrobe červených vín v Južnej Afrike. Cieľom výskumu bolo zvýšiť záujem a povedomie o mikrobiologických rizikách a taktiež dôraz na prevenciu pred chorobami vína spôsobené mikroorganizmami skôr ako príde k samotnej kontaminácii a znehodnoteniu finálneho produktu. Výsledky výskumu ukázali, že kvasinky *Brettanomyces* sa bežne nachádzajú v týchto vínach a nejedná sa o žiaden fenomén. Jedným z výstupov výskumu bolo nájdenie čo najvhodnejšieho média pre izoláciu týchto kvasiniek. Ako najoptimálnejšie boli označené DBM (*Dekkera/Brettanomyces* Differential Medium) a WLN Agar médium pre bežné mikrobiologické identifikácie mikroorganizmov. (OELOFSE, 2008)

3.8.5 Austrália

V Austrálii sa nachádza jeden z najvýznamnejších a najaktívnejších inštitútov zaoberajúci sa kvasinkami *Brettanomyces* a problematikou animality vín. Jedná sa o Inštitút AWRI (The Australian Wine Research Institute), ktorý už niekoľko desiatok rokov spolupracuje s austrálskymi ale aj zahraničnými vinármi s cieľom kontroly a zamedzenia možného znehodnotenia vín kvasinkami *Brettanomyces*. Ich výskum je založený na skúmaní tejto kvasinky už na genetickej úrovni a jedným z ich cieľov je na základe jej kompletne zmapovaného genomu objaviť gény zodpovedné napríklad za zvýšenú rezistenciu k siričitanom a tým pádom možnosť účinnejšie potlačiť infekciu spôsobenú *Brettanomyces*. Vďaka aplikácii poznatkov získaných z výskumného inštitútu, ktoré sú pravidelne vydávané vo forme vedeckých prác alebo článkov je možné ekonomickejšie bojovať proti rozvoju týchto kvasiniek v jednotlivých vinárstvach. (www.awri.com.au, 2015)

4 Komentár

Aj napriek množstvu prebiehajúcich výskumov, pokusov a publikovaných prác nie je téma kvasiniek *Brettanomyces* a prchavých fenolov stále dostatočne preskúmaná a niektoré vedecké práce sa vo svojich výsledkoch úplne nezhodujú. To isté platí aj o odbornej spoločnosti, ktorá nemá na túto problematiku rovnaký názor a tam kde niektorí vidia problém, iní ho považujú za benefit. Aj napriek tomu je výskyt kvasiniek rodu *Brettanomyces* vo víne väčšinou považovaný za nežiaduci. V menšej miere nemusia byť pre víno úplne negatívne a mnoho krát ich metabolické produkty, prchavé fenoly, dodávajú nezameniteľnú a pre autora práce zaujímavú chuť, avšak ak sú prítomné vo väčšom množstve dochádza väčšinou k znehodnoteniu vín. Vytvárajú nežiaduce pachy, zmenu chuti a kazia tak organoleptické vlastnosti vína.

Počas písania tejto práce autor dospel k záveru, že najúčinnjšou formou ochrany a spôsobom zabránenia kontaminácie je naozaj dôkladná a mnohokrát časovo aj finančne náročná sanitácia všetkých častí vinárstva, ktoré prichádzajú do styku s vyrábaním vínom. Špeciálnu pozornosť si vyžadujú zle prístupné plochy ako napríklad: vnútorné časti čerpadiel či hadíc, obzvlášť drevené sudy, ktoré sú často primárnym zdrojom infekcie vďaka ich opakovanému používaniu, ťažkému čisteniu a náročnej starostlivosti môžu negatívne ovplyvniť mnoho šarží vína.

Taktiež má autor na základe vykonanej literárnej rešerše názor, že je tematike v Českej republike ale aj na Slovensku venovaná nedostatočná pozornosť a osвета. Mnohokrát nevedia ani samotní výrobcovia, najmä z radov menších vinárstiev o spôsoboch prevencie, prípadne o tomto probléme neradi diskutujú, nakoľko sa obávajú negatívneho hodnotenia ich vín ostatnou zainteresovanou spoločnosťou a snažia sa radšej o maskovanie tohto javu miesto jeho odstránenia. Opakom tohto prístupu sú vinárstva najmä v zahraničí, ktoré tento hendikep dokázali využiť ako marketingovú výhodu a predaj takto ozvláštneného vína je jedným z ich finančných príjmov.

V každom prípade, bez ohľadu na to či odborná verejnosť alebo bežný konzument tento fenomén považuje za chybu alebo prednosť, je spracovávaná téma veľmi zaujímavá a určite sa jej oplatí venovať ďalší výskum.

5 Záver

Kým sa víno dostane do rúk finálneho zákazníka musí prejsť dlhú cestu počínajúc zberom hrozna vo vinici, spracovaním vo vinárstve až po samotnú distribúciu. Počas tejto cesty sa v ňom premieňa a vzniká množstvo látok, medzi ktoré patrí aj fenomén, ktorému bola táto práca venovaná.

Témou práce boli kvasinky *Brettanomyces bruxelensis* v technológií vín. Po preštudovaní dostupnej odbornej literatúry sa autor venoval hlavným bodom spracovávanej problematiky. V samom úvode boli kvasinky predstavené v historickom kontexte a objasnené ich dvojaké taxonomické pomenovanie. Následne bol čitateľ oboznámený s ich morfológiou a prostredím, v ktorom žijú a podmienkami pre ich množenie a rozvoj. To súvisí so spôsobmi, ktorými sa môžu dostávať do vína a infikovať ho.

Ďalším z bodov, ktorým bola venovaná pozornosť sú prekursori prchavých fenolov, ich význam, výskyt, koncentrácia v hroznách a víne a následná enzymatická premena na prchavé fenoly. Taktiež bol vysvetlený chemický princíp tejto premeny a boli pomenované enzýmy zúčastňujúce sa tohto procesu. Okrem samotných prchavých fenolov sa práca venovala aj ostatným látkam produkovanými *Brettanomyces* ako sú kyselina octová, prchavé masťné kyseliny alebo látky, ktoré stoja za chorobami vína ako napríklad myšina.

Bolo vysvetlené, že okrem *Brettanomyces* sú schopné aj iné mikroorganizmy vytvárať tieto produkty avšak v omnoho menších koncentráciách. Jedným z bodov boli aj samotné senzorické prejavy prchavých fenolov, ich označenie ako animálne tóny a taktiež ich zmyslové vnímanie konzumentom.

Veľká časť práce sa venovala fyzikálnym, mechanickým a chemickým metódam, ktoré majú zabrániť kontaminácii vína a ak už ku kontaminácii prišlo, ako ju čo najšetrnejšie potlačiť v ideálnom prípade odstrániť bez značného ovplyvnenia kvality výsledného vína. Okrem toho sa tento bod zaoberal spôsobmi ako čo najpresnejšie zistiť prítomnosť kvasiniek *Brettanomyces bruxelensis* a tiež metódam na stanovenie koncentrácie prchavých fenolov v postihnutých vínach.

V záverečnej časti práce bola venovaná pozornosť problematike a vnímaniu týchto kvasiniek v zahraničí, výsledkom čoho bolo zistenie, že v mnohých krajinách a najmä

v Austrálii je téme venovaná značná pozornosť a hľadajú sa čo najsofistikovanejšie riešenia tohto problému.

6 Súhrn

Témou predkladanej bakalárskej práce je ovplyvnenie vín kvasinkami *Brettanomyces bruxelensis* a prchavými fenolmi, ktoré sú ich metabolickými produktmi. V prvej kapitole bol stanovený hlavným cieľ práce a boli určené sekundárne ciele, ktoré nám pomohli k jeho naplneniu. V kapitole súčasný stav riešenej problematiky bol na základe dostupnej domácej a najmä zahraničnej literatúry vytvorený teoretický základ práce. V ôsmich podkapitolách je rozobratá história a pôvod kvasiniek *Brettanomyces*, zdroje a spôsoby kontaminácie vín týmito kvasinkami a ďalšími mikroorganizmami, vplyvom prchavých fenolov, ich prekurzorov a ostatných sekundárnych metabolitov na senzorický profil takto postihnutých vín, spôsoby prevencie a následného ošetrenia napadnutého produktu ako aj zmapovaním situácie v zahraničí. V komentári je predkladaný pohľad na riešenie problematiky očami autora práce.

Kľúčové slová: kvasinky, *Brettanomyces*, víno, prchavé fenoly, animalita, prevencia, senzorické prejavy

7 Resume

The topic of this bachelor thesis is the influence of *Brettanomyces bruxelensis* yeasts and volatile phenols, which are their metabolic products, on wines. The first chapter outlines the main goal of the work and identifies the secondary goals that helped us to fulfill it. Next chapter deals with the current state of addressed issues based on the available domestic and especially foreign literature creating the theoretical basis of the work. The eight subchapters deal with the history and origin of *Brettanomyces* yeasts, sources and methods of contamination of wines with these yeasts and other microorganisms, the effects of volatile phenols, their precursors and other secondary metabolites on the sensory profile of the affected wines, of prevention and subsequent treatment of the infected product as well as mapping of the situation abroad. The commentary presents a view of the problem solved by the author's eyes.

Key words: yeast, *Brettanomyces*, wine, volatile phenols, animal tones, prevention, sensory expressions

8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. BAROŇ, Mojmír. *Možnosti snížení obsahu oxidu siřičitého ve víně: část II* [online]. Vinařský obzor, 2013, 2013(9) [cit. 2017-04-10]. ISSN 1212-7884. Dostupné z: www.vinarskyobzor.cz
2. BENITO, S., F. PALOMERO, A. MORATA, F. CALDERÓN a J.A. SUÁREZ-LEPE. Factors Affecting the Hydroxycinnamate Decarboxylase/Vinylphenol Reductase Activity of *Dekkera/Brettanomyces*: Application for *Dekkera/Brettanomyces* Control in Red Wine Making. *Journal of Food Science* [online]. 2009, **74**(1), M15-M22 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2008.00977.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2008.00977>
3. CALVENZANI, Valentina, Antonella CASTAGNA, Annamaria RANIERI, Chiara TONELLI a Katia PETRONI. Hydroxycinnamic acids and UV-B depletion: Profiling and biosynthetic gene expression in flesh and peel of wild-type and hp-1. *Journal of Plant Physiology* [online]. 2015, **181**, 75-82 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1016/j.jplph.2015.04.008. ISSN 01761617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161715001121>
4. CAMPOLONGO, S., K. RANTSIOU, M. GIORDANO, V. GERBI a L. COCOLIN. Prevalence and Biodiversity of *Brettanomyces bruxellensis* in Wine from Northwestern Italy. *American Journal of Enology and Viticulture* [online]. 2010, **61**(4), 486-491 [cit. 2017-04-22]. DOI: 10.5344/ajev.2010.10034. ISSN 0002-9254. Dostupné z: <http://www.ajevonline.org/cgi/doi/10.5344/ajev.2010.10034>
5. CASTRO-MARTINEZ, C., B.I. ESCUDERO-ABARCA, J. GOMEZ RODRIGUEZ, P.M. HAYWARD-JONES a M.G. AGUILAR-USCANGA. EFFECT OF PHYSICAL FACTORS ON ACETIC ACID PRODUCTION IN BRETTANOMYCES STRAINS. *Journal of Food Process Engineering* [online]. 2005, **28**(2), 133-143 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1111/j.1745-4530.2005.00393.x. ISSN 0145-8876. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1745-4530.2005.00393.x>
6. COULON, J., M.C. PERELLO, A. LONVAUD-FUNEL, G. DE REVEL a V. RENOUF. *Brettanomyces bruxellensis* evolution and volatile phenols production in red wines during storage in bottles. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2010, **108**(4), 1450-1458 [cit. 2017-04-07]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04561.x. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2009.04561.x>
7. COUTO, J.A., A. BARBOSA a T. HOGG. A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* in wines. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2005, **41**(6), 505-510 [cit. 2017-04-12]. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01782.x. ISSN 02668254. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2005.01782.x>

8. CURTIN, C., C. VARELA a A. BORNEMAN. Harnessing improved understanding of *Brettanomyces bruxellensis* biology to mitigate the risk of wine spoilage. *Australian Journal of Grape and Wine Research* [online]. 2015, 21, 680-692 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1111/ajgw.12200. ISSN 13227130. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ajgw.12200>
9. ČERNOHORSKÁ, Dominika. *Animální tóny v červených vínech a jejich možné stanovení na GC-MS*. Lednice, 2012. Bakalářská práce. Mendelova univerzita. Vedoucí práce Doc. Mojmír Baroň, Ph.D.
10. DI TORO, Maria Rosaria, Vittorio CAPOZZI, Luciano BENEDEUCE, et al. Intraspecific biodiversity and 'spoilage potential' of *Brettanomyces bruxellensis* in Apulian wines. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2015, 60(1), 102-108 [cit. 2017-04-22]. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.06.059. ISSN 00236438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643814004277>
11. DU TOIT, W.J., I.S. PRETORIUS a A. LONVAUD-FUNEL. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2005, 98(4), 862-871 [cit. 2017-04-07]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02549.x. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2004.02549.x>
12. EDER, Reinhard. *Vady vína*. Vyd. 1. Valtice: Národní vinařské centrum, 2006, 263 s. ISBN 80-903-2016-3.
13. ELLSWORTH, A. : 7,000 Year-old Wine Jar [online]. In: *University of Pennsylvania Museum of Archaeology and Anthropology*, [cit. 2017-02-08]. Dostupné z: <https://www.penn.museum/blog/collection/125th-anniversary-object-of-the-day/7000-year-old-wine-jar-object-of-the-day-24/>
14. HARRIS, Victoria. *Physiological, biochemical and molecular characterisation of hydroxycinnamic acid catabolism by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeast* [online]. The University of Adelaide, 2011 [cit. 2017-03-27]. Dostupné z: <http://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/bitstream/2440/60535/2/01front.pdf>
15. HENICK-KLING, Thomas, et al., Thomas. *Brettanomyces in Wine*. Fifth International Symposium on Cool Climate Viticulture & Oenology. Melbourne, 2000.
16. CHÁBEROVÁ, Hana. *Kvasinky *Brettanomyces bruxellensis* v technologii vín*. Lednice, 2016. Bakalářská práce. Mendelova univerzita. Vedoucí práce Doc. Ing. Mojmír Baroň, Ph.D.
17. KAČER, Petr, SYSLOVÁ, Kamila. [online]. 1997 [cit. 2017-04-13]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/kot/resources/studijni-materialy/lab/c.pdf>
18. KRAUS, Vilém, Vítězslav HUBÁČEK a Petr ACKERMANN. *Rukověť vinaře*. 3. vyd. Praha: Brázda, 2010. ISBN 978-80-209-0378-5.

19. KUMŠTA, Michal. *Hydroxyskořicové kyseliny: Část 1* [online]. 2007, **2007**(6) [cit. 2017-03-28]. ISSN 1212-7884. Dostupné z: www.vinarskyobzor.cz
20. KUPSA, Ján, Petra BÁBIKOVÁ a Peter CZAKO. Brettanomyces a jejich význam při výrobě vína. *Sady a vinice*. 2011, č. 6.
21. LAFORGUE, R. a A. LONVAUD-FUNEL. Hydroxycinnamic acid decarboxylase activity of Brettanomyces bruxellensis involved in volatile phenol production: Relationship with cell viability. *Food Microbiology* [online]. 2012, **32**(2), 230-234 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1016/j.fm.2012.06.004. ISSN 07400020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002012001281>
22. MARTYNIAK, Brian, Jason BOLTON, Dmitry KUKSIN, Suzanne M. SHAHIN a Leo Li-Ying CHAN. A novel concentration and viability detection method for Brettanomyces using the Cellometer image cytometry. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 2017, 44(1), 119-128 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1007/s10295-016-1861-4. ISSN 1367-5435. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-016-1861-4>
23. MORNEAU, A.D., J.M. ZUEHLKE a C.G. EDWARDS. Comparison of media formulations used to selectively cultivate Dekkera/Brettanomyces. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2011, roč. 53, č. 4, s. 460-465 [cit. 2017-04-10]. ISSN 02668254. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2011.03133.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2011.03133.x>
24. OELOFSE, A., S. MALHERBE, I.S. PRETORIUS a M. DU TOIT. Preliminary evaluation of infrared spectroscopy for the differentiation of Brettanomyces bruxellensis strains isolated from red wines. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2010-10-15, roč. 143, č. 3, s. 136-142 [cit. 2017-03-28]. ISSN 01681605. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160510004514>
25. OELOFSE, Adriaan. *Investigating the role of Brettanomyces and Dekkera during winemaking*. Stellenbosh, 2008. Dissertation. Stellenbosh University.
26. [online]. [cit. 2017-04-08]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?nid=11429&docid=1006660&chnum=3>
27. [online]. [cit. 2017-04-10]. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=13&typ=1&val=27124&ids=421>
28. [online]. [cit. 2017-04-10]. Dostupné z: <http://www.scottlab.com/products-129.aspx>
29. [online]. [cit. 2017-04-10]. Dostupné z: <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/massspec/masspec1.htm>

30. [online]. [cit. 2017-04-10]. Dostupné z: <https://www.awri.com.au/wp-content/uploads/2013/01/2015-awri-annual-report.pdf>
31. PAVLOUŠEK, Pavel. *Výroba vína u malovinařů*. 1. Praha: Grada, 2006. 100s. ISBN 80-247-1247-4.
32. PUIG, Anna, Eva BERTRAN, Rosó FRANQUET, Joan GARCÍA a Santiago MÍNGUEZ. Brettanomyces bruxellensis prevalence in wines produced and marketed in Spain. *Annals of Microbiology* [online]. 2011, **61**(1), 145-151 [cit. 2017-04-22]. DOI: 10.1007/s13213-010-0075-7. ISSN 1590-4261. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13213-010-0075-7>
33. RAYNE, Sierra a Nigel J. EGGERS. 4-Ethylphenol and 4-Ethylguaiacol concentrations in barreled red wines from the Okanagan Valley Appellation, British Columbia. *American journal of enology and viticulture* [online]. 2008 [cit. 2012-04-11]. Dostupné z: <http://www.ajevonline.org/content/59/1/92.abstract>
34. RENOUF, V., M. FALCOU, C. MIOT-SERTIER, M. C. PERELLO, G. DE REVEL a A. LONVAUD-FUNEL. Interactions between Brettanomyces bruxellensis and other yeast species during the initial stages of winemaking. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2006, 100(6), 1208-1219 [cit. 2017-03-25]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.02959.x. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2006.02959.x>
35. RIBÉREAU-GAYON, P., Y. GLORIES, A. MAUJEAN a D. DUBOURDIEU. Microbiological Origin and Synthesis Pathways of Ethyl-Phenols in Red Wines: *Handbook of enology*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, 2006, s. 251. ISBN 0-470-01037-1.
36. RODRIGUES, N., G. GONCALVES, S. PEREIRA-DA-SILVA, M. MALFEITO-FERREIRA a V. LOUREIRO. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera Dekkera/Brettanomyces. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2001, **90**(4), 588-599 [cit. 2017-04-12]. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01275.x. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2001.01275.x>
37. ROMANO, A., M.C. PERELLO, G. de REVEL a A. LONVAUD-FUNEL. Growth and volatile compound production by Brettanomyces/Dekkera bruxellensis in red wine. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2008, **104**(6), 1577-1585 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03693.x. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2007.03693.x>
38. RUBIO, P., P. GARIJO, P. SANTAMARÍA, R. LÓPEZ, J. MARTÍNEZ a A.R. GUTIÉRREZ. Influence of oak origin and ageing conditions on wine spoilage by Brettanomyces yeasts. *Food Control* [online]. 2015, **54**, 176-180 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.01.034. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713515000651>

39. SANTOS, Antonio, Eva NAVASCUÉS, Enrique BRAVO a Domingo MARQUINA. Ustilago maydis killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2011, **145**(1), 147-154 [cit. 2017-04-26]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.005. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160510006951>
40. SERPAGGI, Virginie, Fabienne REMIZE, Ghislaine RECORBET, Eliane GAUDOT-DUMAS, Anabelle SEQUEIRA-LE GRAND a Hervé ALEXANDRE. Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiology* [online]. 2012, **30**(2), 438-447 [cit. 2017-04-13]. DOI: 10.1016/j.fm.2011.12.020. ISSN 07400020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002011003030>
41. SCHIFFERDECKER A. J., DASHKO S., ISHCHUK O. P. AND PIŠKUR J. (2014), The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*, *Yeast*, 31, pages 323–332, doi: 10.1002/yea.3023
42. SMITH, Brendan D. a Benoit DIVOL. *Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages. *Food Microbiology* [online]. 2016, **59**, 161-175 [cit. 2017-03-25]. DOI: 10.1016/j.fm.2016.06.008. ISSN 07400020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002016302659>
43. STEIDL, Robert a Wolfgang RENNER. *Problémy kvašení vín*. Přeložil Josef BALÍK. Valtice: Národní salon vín, 2004. ISBN 80-903201-3-9.
44. STEIDL, Robert. *Sklepní hospodářství*. V českém jazyce vyd. 1. Valtice: Národní salon vín, 2002, 307 s. ISBN 80-903-2010-4..
45. SUÁREZ, R., J.A. SUÁREZ-LEPE, A. MORATA a F. CALDERÓN. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry* [online]. 2007, **102**(1), 10-21 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.03.030. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814606002457>
46. TEMPÈRE, S., E. CUZANGE, M.H. SCHAAPER, R. DE LESCAR, G. DE REVEL a G. SICARD. € „Brett character” in wine: Is there a consensus among professional assessors? A perceptual and conceptual approach. *Food Quality and Preference* [online]. 2014, **34**, 29-36 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/j.foodqual.2013.12.007. ISSN 09503293. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0950329313002413>
47. TESSONNIÈRE, H., S. VIDAL, L. BARNAVON, H. ALEXANDRE a F. REMIZE. Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2009, **129**(3), 237-243 [cit. 2017-04-12]. DOI:

10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.027. ISSN 01681605. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160508006193>

48. TCHOBANOV, Iavor, Laurent GAL, Michèle GUILLOUX-BENATIER, Fabienne REMIZE, Tiziana NARDI, Jean GUZZO, Virginie SERPAGGI a Hervé ALEXANDRE. Partial vinylphenol reductase purification and characterization from *Brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2008, **284**(2), 213-217 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01192.x. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2008.01192.x>
49. WEDRAL, Danielle, Robert SHEWFELT a Joseph FRANK. The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2010, **43**(10), 1474-1479 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1016/j.lwt.2010.06.010. ISSN 00236438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643810002288>
50. ZHANG, Bo, Fei HE, Pan-Pan ZHOU, Yue LIU a Chang-Qing DUAN. Copigmentation between malvidin-3-O-glucoside and hydroxycinnamic acids in red wine model solutions: Investigations with experimental and theoretical methods. *Food Research International* [online]. 2015, **78**, 313-320 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.09.026. ISSN 09639969. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996915302003>

9 ZOZNAM OBRÁZKOV, TABULIEK A GRAFOV

Obrázky

Obrázok 1: Kvasinka *Brettanomyces Bruxellensis*

Obrázok 2: Tvorba prchavých fenolov

Tabuľky

Tab. 1: Senzorické prejavy animálnych tónov