

Mendelova univerzita v Brně

Zahradnická fakulta v Lednici

Vliv doby inokulace na průběh malolaktické fermentace

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Mojmír Baroň, Ph.D.

Vypracoval:

Bc. Radim Hasil

Lednice 2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatel : **Bc. Radim Hasil**
Studijní program: Zahradnické inženýrství
Obor: Řízení zahradnických technologií
Název tématu: **Vliv doby inokulace na průběh malolaktické fermentace**
Rozsah práce: 40-50

Zásady pro vypracování:

1. Prostudování dostupné literatury. Průzkum komerčně dostupných bakterií pro MLF v souvislosti s jejich načasováním inokulace.
2. Zajištění vzorků vín s různým načasováním aplikace bakterií. Analytické hodnocení v průběhu pokusu. Senzorické zhodnocení.
3. Statistické vyhodnocení a diskuze získaných výsledků. Doporučení pro praxi.

Seznam odborné literatury:

1. STEIDL, R. – RENNER, W. *Moderní příprava červeného vína*. 1. vyd. Valtice: Národní salon vín, 2003. 72 s. ISBN 80-903201-2-0.
2. STEIDL, R. – RENNER, W. *Problémy kvašení vín*. 1. vyd. Valtice: Národní salon vín, 2004. 74 s. ISBN 80-903201-3-9.
3. RIBÉREAU-GAYON, P. – BRANCO, J M. *Handbook of enology. : The microbiology of wine and vinifications. volume 1*. Chichester, West Sussex, England. 2006. ISBN 97804700103651, 97804700103411. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/0470010363>.
4. BAROŇ, M. Malolaktická fermentace. *Vinič a víno*. 2013. sv. 6, s. 100–101. ISSN 1335-7514.
5. VESELÝ, R. *Vliv malolaktické fermentace na aromatický profil červeného vína*. Bakalářská práce. Lednice: MENDELU Brno, 2013. 57 s.
6. KARASOVÁ, B. *Vplyv malolaktickej fermentácie na aromatický profil bieleho vína*. Bakalářská práce. Lednice: MENDELU Brno, 2013. 41 s.

Datum zadání diplomové práce: prosinec 2014

Termín odevzdání diplomové práce: květen 2016

L. S.


Bc. Radim Hasil
Autor práce




doc. Ing. Mojmir Baroň, Ph.D.
Vedoucí práce


doc. Ing. Mojmir Baroň, Ph.D.
Vedoucí ústavu


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

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci „*Vliv doby inokulace na průběh malolaktické fermentace*“ vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

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

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

V Lednici dne: 19. 4. 2016


.....
Podpis studenta

Děkuji všem, kteří mi pomáhali cennými radami, připomínkami a odborným vedením při vypracovávání diplomové práce.

Zvláštní poděkování patří především doc. Ing. Mojmiru Baroňovi Ph.D. za odborné vedení, čas a spolupráci. Děkuji také společnosti BS vinařské potřeby, s.r.o., za poskytnuté preparáty, zejména panu Ing. Miloši Vidlářovi.

Obsah

1	Úvod	12
2	Cíl práce	14
3	Literární přehled	15
3.1	Bakterie	15
3.1.1	Růstová křivka bakterií	16
3.2	Bakterie hroznů a vína	17
3.3	Bakterie mléčného kvašení	18
3.3.1	Rod <i>Lactobacillus</i>	20
3.3.2	Rod <i>Leuconostoc</i>	21
3.3.3	Rod <i>Oenococcus</i>	21
3.3.4	Rod <i>Pediococcus</i>	22
3.3.5	Rod <i>Weissela</i>	23
3.4	Metabolismus	24
3.4.1	Glukóza	24
3.4.2	Kyselina citronová	25
3.4.3	Transformace kyseliny jablečné	26
3.5	Malolaktická fermentace (MLF)	26
3.5.1	Výživa	27
3.5.2	Stresové faktory	28
3.5.3	Stresové mechanismy související s adaptací <i>Oenococcus oeni</i> ve víně	30
3.5.4	Vzájemné působení (interakce) mezi mikroorganismy MLF	31
3.5.5	Spontánní MLF	32
3.5.6	Inokulace	33
3.5.7	Vliv MLF na objem vazebných partnerů SO ₂	37
3.5.8	Vliv MLF na aromatický profil vína	38

3.6	Vady vín způsobené mléčnými bakteriemi a MLF	39
3.6.1	Těkavé kyseliny a octovatění	39
3.6.2	Diacetyl	40
3.6.3	Vláčkovatění (olejnatění)	40
3.6.4	Manit a akrolein	40
3.6.5	Myšina	41
3.6.6	Biogenní aminy	41
4	Praktická část	43
4.1	Materiál a metody	43
4.1.1	Základní materiál	43
4.1.2	Kvasinky BS8	44
4.1.3	Bakteriální kultury	44
4.1.4	ALPHA	45
4.1.5	Kapalinová chromatografie	45
4.1.6	Titrační metody a stanovení pH	46
4.1.7	Senzorická analýza	47
4.2	Metoda zpracování	48
4.2.1	Měření a analýzy	50
4.3	Výsledky změny obsahu sledovaných kyselin v průběhu MLF	50
4.3.1	Vzorek RH1	51
4.3.2	Vzorek RH2	52
4.3.3	Vzorek RH3	53
4.3.4	Vzorek RH4	54
4.3.5	Vzorek RH5	55
4.3.6	Vzorek RH6	56
4.3.7	Hodnoty kyseliny citronové v průběhu MLF	57
4.4	Výsledky sensorického hodnocení vína	58

4.4.1	Senzorické vyhodnocení vína (stobodový systém).....	58
4.4.2	Chuťově aromatický profil vína	59
4.5	Statistická analýza	64
4.5.1	Obsah kyseliny citronové u bakteriálního kmene VINIFLORA®-CiNe™ a VINIFLORA®-OENOS po MLF.....	64
4.5.2	Celková změna průměrného obsahu kyseliny citronové u bakteriálního kmene VINIFLORA®-CiNe™	65
4.5.3	Celková změna průměrného obsahu kyseliny citronové u bakteriálního kmene VINIFLORA®-OENOS	66
4.5.4	Senzorické hodnocení 100-bodový systém	67
5	Diskuze	68
6	Závěr.....	70
7	Souhrn.....	71
8	Resume	72
9	Seznam použité literatury	73

Seznam obrázků

Obrázek 1	Růstová křivka buněčné kultury.	16
Obrázek 2	<i>Lactobacillus brevis</i>	20
Obrázek 3	<i>Oenococcus oeni</i>	21
Obrázek 4	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	22
Obrázek 5	Metabolismus glukózy homo- nebo heterofermentativní cestou bakteriemi mléčného kvašení	24
Obrázek 6	Metabolismus kyseliny citronové.	25
Obrázek 7	Dekarboxylace kyseliny jablečné.....	26
Obrázek 8	Analyzátor Alpha wine ATR	45
Obrázek 9	Stobodová degustační tabulka k hodnocení vín.....	47

Seznam tabulek

Tabulka 1	Bakterie mléčného kvašení izolované z moštu a vína.....	19
-----------	---	----

Tabulka 2 Klasifikace bakterií mléčného kvašení vyskytujících se v moštu a víně	19
Tabulka 3 Enologické pokyny pro výběr startovacích komerčních kultur bakterií MLF	34
Tabulka 4 Přehled doby inokulace a použitých bakteriálních kmenů MLF.....	49
Tabulka 5 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH1, (inokulace na začátku AF citrát-negativní kmen VINIFLORA®-CiNe™).....	51
Tabulka 6 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH2, (inokulace ke konci AF citrát-negativní kmen VINIFLORA®-CiNe™).....	52
Tabulka 7 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH3, (inokulace po AF citrát-negativní kmen VINIFLORA®-CiNe™).....	53
Tabulka 8 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH4, (inokulace na začátku AF kmenem (DSM 7008) VINIFLORA®-OENOS).....	54
Tabulka 9 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH5, (inokulace ke konci AF kmenem (DSM 7008) VINIFLORA®-OENOS).....	55
Tabulka 10 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH6, (inokulace po AF kmenem (DSM 7008) VINIFLORA®-OENOS).....	56
Tabulka 11 Spotřeba kyseliny citronové v průběhu MLF bakteriálními kmeny VINIFLORA®-OENOS a VINIFLORA®-CiNe™ s různou dobou inokulace.....	57
Tabulka 12 Sensorické vyhodnocení vína po MLF (stobodový systém).....	58
Tabulka 13 T-test kyseliny citronové pro oba kmeny po MLF	64
Tabulka 14 T-test kyseliny citronové pro bakteriální kmen VINIFLORA®-CiNe™	65
Tabulka 15 T-test kyseliny citronové pro kmen VINIFLORA®-OENOS	66
Tabulka 16 T-test sensorického hodnocení 100-bodový systém.....	67

Seznam grafů

Graf 1 Obecný vývoj populace kvasinek a BMK v průběhu fermentace	32
Graf 2 Příklad spontánní MLF a inokulace kmene <i>Oenococcus oeni</i>	35
Graf 3 Spotřeba kyseliny jablečné a kyseliny citronové za použití bakterií <i>Oenococcus oeni</i> , zahrnující citrát-negativní kmen (CiNe) a běžný kmen (<i>Oenos</i>) v bílém víně	36
Graf 4 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH1, (inokulace na začátku AF citrát-negativní kmen VINIFLORA®-CiNe™).....	51
Graf 5 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH2, (inokulace ke konci AF citrát-negativní kmen VINIFLORA®-CiNe™).....	52

Graf 6 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH3, (inokulace po AF citrát-negativní kmen VINIFLORA®-CiNe™).	53
Graf 7 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH4, (inokulace na začátku AF kmenem (DSM 7008) VINIFLORA®-OENOS).	54
Graf 8 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH5, (inokulace ke konci AF kmenem (DSM 7008) VINIFLORA®-OENOS).	55
Graf 9 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH6, (inokulace po AF kmenem (DSM 7008) VINIFLORA®-OENOS).	56
Graf 10 Spotřeba kyseliny citronové v průběhu MLF bakteriálními kmeny VINIFLORA®-OENOS a VINIFLORA®-CiNe™ s různou dobou inokulace.	57
Graf 11 Aromatický profil, vzorek RH1. Použité bakterie VINIFLORA®-CiNe™ (citrát-negativní), inokulace na začátku AF spolu s kvasinkami.	59
Graf 12 Aromatický profil, vzorek RH4. Použité bakterie VINIFLORA®-OENOS, inokulace na začátku AF spolu s kvasinkami.	59
Graf 13 Aromatický profil, vzorek RH2. Použité bakterie VINIFLORA®-CiNe™, (citrát-negativní) inokulace ke konci AF.	60
Graf 14 Aromatický profil, vzorek RH5. Použité bakterie VINIFLORA®-OENOS, inokulace ke konci AF.	60
Graf 15 Aromatický profil, vzorek RH3. Použité bakterie VINIFLORA®-CiNe™, (citrát-negativní) inokulace dva dny po AF.	61
Graf 16 Aromatický profil, vzorek RH6. Použité bakterie VINIFLORA®-OENOS, inokulace dva dny po AF.	61
Graf 17 Porovnání vlivu doby inokulace citrát-negativních bakterií na aromatický profil vína odrůdy Zweigeltrebe, vzorky RH1, RH2, RH3.	62
Graf 18 Porovnání vlivu doby inokulace komerčních bakterií na aromatický profil vína odrůdy Zweigeltrebe, vzorky RH4, RH5, RH6.	63
Graf 19 Krabicový graf porovnání obsahu kyseliny citronové u bakteriálních kmenů VINIFLORA®-CiNe™ a VINIFLORA®-OENOS po MLF.	64
Graf 20 Krabicový graf průměrného obsahu kyseliny citronové u bakteriálního kmene VINIFLORA®-CiNe™ před a po MLF.	65
Graf 21 Krabicový graf průměrného obsahu kyseliny citronové u bakteriálního kmene VINIFLORA®-OENOS před a po MLF.	66
Graf 22 Krabicový graf 100 bodové hodnocení vín po MLF	67

Seznam zkratk

AF – alkoholová fermentace

MLF – malolaktická fermentace

CFU – kolonie tvořící jednotky (colony-forming-unit)

MB – mléčné bakterie

BMK – bakterie mléčného kvašení

3-HPA – 3-hydroxypropionaldehyd

3-HP – kyselina 3-hydroxypropionová

1,3-PDL – 1,3-propandiol

EMP - Embden-Meyerhof-Parnas dráhy

1 Úvod

Mikroorganismy, v současné době s velkým zájmem a usilovně studované, jsou sice pouhým okem neviditelné, ale velmi důležité v roli „výrobců vína“. Ovlivňují stabilitu, charakter a celkový chuťový projev vín. Velmi dobře popsány a nejvíce používanými mikroorganismy fermentujícími mošt a víno jsou kvasinka rodu *Saccharomyces* a bakterie rodu *Oenococcus*. Pokroky v biotechnologiích rozšiřují možnosti vinařů a rozvíjí nové trendy při výrobě vína. Používání mléčných bakterií (MB) je nedílnou součástí výroby vína takřka ve všech vinařstvích. Hlavní úlohou bakterií je přeměna drsnější kyseliny L-jablečné na jemnější kyselinu L-mléčnou, procesem definovaným jako malolaktická fermentace (MLF, tzv. jablečno-mléčné kvašení), nebo také biologické (bakteriální) odbourávání organických kyselin.

Mléčné bakterie mají schopnost růstu ve víně a hroznovém moštu při nízkém pH a za přítomnosti etanolu. Jsou důležitým elementem pozitivně i negativně ovlivňujícím kvalitu bílých, a hlavně červených vín. *Oenococcus oeni* je druhem mléčné bakterie, který se nejlépe přizpůsobil prostředí moštu a vína. Díky porozumění fyziologii metabolismu a genetiky mléčných bakterií mají vinaři možnost vybrat vhodný bakteriální kmen. Vinaři takto získávají kontrolu nad bakteriální aktivitou a zvyšují blahodárné účinky za současné eliminace škodlivých vlivů na kvalitu vína. Malolaktická fermentace (MLF) celkově zvyšuje ovocný i máselný projev vína a současně snižuje rostlinné nebo travnaté tóny. Intenzivnější ovocný aromatický projev vína je způsobován produkcí esterů mléčnými bakteriemi a máselné aroma je důsledkem tvorby diacetylu z fermentace kyseliny citronové. Opatřením pro zamezení tvorby nežádoucích látek, jako je diacetyl a acetát, je použití citrát-negativního bakteriálního kmene. Ve srovnání s obvyklou bakteriální kulturou nezahrnují tyto bakterie kyselinu citronovou do svého metabolismu, a ta zůstává zachována jako důležitá složka struktury kyselin ve víně. Během malolaktické fermentace populace mléčných bakterií dosahuje v průměru 10^7 CFU.ml⁻¹ (jednotek tvořících kolonie).

Načasování inokulace bakterií je neustále diskutovaný proces, jehož cílem je dosažení co nejvyšší kvality vína. V současnosti se většinou malolaktická fermentace provádí až ve víně po alkoholové fermentaci, ale může být provedena společně s kvasinkami do moštu na začátku alkoholové fermentace, v průběhu nebo ke konci alkoholové fermentace s využitím zbytkového tepla. Záleží však na kvalitě vstupní

suroviny a požadavku na výsledný produkt. Snahou je zákazníkovi nabídnout produkt nejvyšší kvality, který svou nezaměnitelnou chutí a aromatem vystihuje charakter oblasti a dané odrůdy. Je jen na zkušenostech sklepmistra, zda proces výroby vína proběhne zdárně a povede k požadovanému výsledku. Výrobu kvalitních vín může podpořit propracovaný management kvality.

Tato práce popisuje problematiku spojenou s malolaktickou fermentací, možné způsoby provedení a faktory ovlivňující její průběh. Dále popisuje druhy mléčných bakterií, metabolismus mléčných bakterií a vliv na celkový projev vína. Zmiňuje nejčastější choroby a vady spojené s malolaktickou fermentací a působením mléčných bakterií.

Pokusná část je zaměřena na pozorování průběhu malolaktické fermentace. Byly použity dva odlišné bakteriální kmeny a různá doba načasování inokulace do červeného vína. Následovně byla sledována přeměna kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou, spotřeba kyseliny citronové a vliv MLF na celkový profil vína.

2 Cíl práce

Úkolem (dle zadání) je prostudování dostupné literatury s tematikou bakteriálního odbourávání organických kyselin a přehledné literární zpracování získaných informací. Experimentální část je založena na pokusu s červeným vínem, u kterého proběhne malolaktická fermentace.

Cílem diplomové práce je uskutečnění odlišných způsobů malolaktické fermentace v červeném víně s inokulací citrát-negativních mléčných bakterií a mléčných bakterií na začátku, na konci a po alkoholové fermentaci, průběžné sledování a analyzování hodnot probíhajícího bakteriálního odbourávání kyselin a následně prozkoumání vlivu činnosti rozdílných kmenů mléčných bakterií a konečné sensorické vyhodnocení vlastností vína.

3 Literární přehled

3.1 Bakterie

Bakterie tvoří samostatnou nadříši *Procaryotae*, zřetelně oddělenou od ostatních organismů, a dělí se na dvě vývojově souběžné velké větve *Archeobacteria* a *Eubacteria*. Bakteriální buňka se skládá z membránami dále neděleného prostoru, v němž se nachází jedna jediná obrovská makromolekula do kruhu kovalentně uzavřené dvojzávitnice DNA. Cytoplazmy jako velmi koncentrovaný vodný roztok mnoha biomolekul zcela vyplňují vnitřní prostor buňky spolu s ribozomy a granulami zásobních látek. Cytoplazmatické membrány ohraničující tento prostor izolují vodné vnitřní prostředí od vnějšího vodného prostředí bakteriální buňky, kde průchodnost pro živiny zabezpečují specifické transportní proteiny (ŠILHÁNKOVÁ, 2008; KAPRÁLEK, 1986). To znamená, že na cytoplazmatické membráně dochází k transformaci energie, což je jedna z hlavních životních funkcí bakteriální buňky (KAPRÁLEK, 1986).

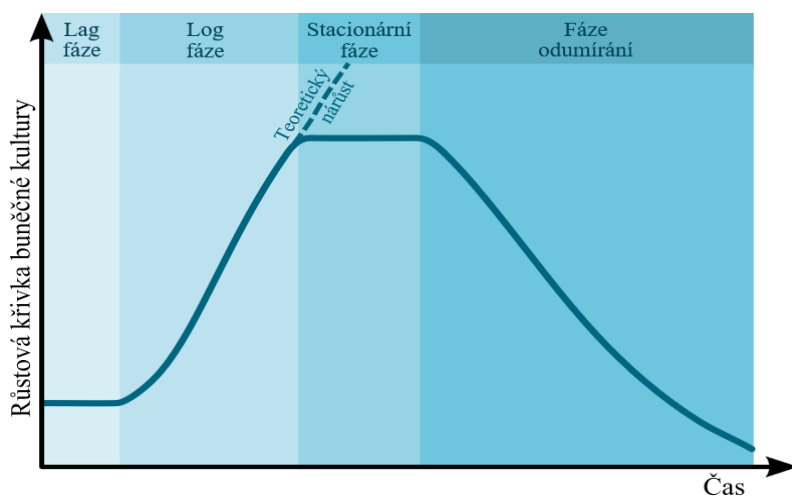
Nad cytoplazmatickou membránou se nachází mechanicky pevná buněčná stěna, která buňce dává tvar a má funkci skeletu ochraňujícího před nepřízní vnějšího prostředí. Lze rozlišit dva typy bakteriální buněčné stěny. Buněčná stěna grampozitivních bakterií je složená z mnoha navzájem propojených vrstev peptidoglykanu, skrze které pronikají lineární řetězce kyseliny teichoové, kotvící stěnu k cytoplazmatické membráně. Buněčná stěna gramnegativních bakterií je složitější stavby, tvořená tenkou vrstvou peptidoglykanu, a nad touto vrstvou ještě dvojvrstvou fosfolipidů s oboustranně vázanými bílkoviny, kotvenou k peptidoglykanu molekulami lipoproteinu. U některých bakterií se může ještě nad buněčnou stěnou nacházet vrstva amorfního organického polymeru různého typu, nazývaného jako slizová vrstva. Ne u všech bakterií mohou být ještě přítomny orgány pohybu, tzv. bičíky, nebo plazmidy ve formě funkčně samostatné, strukturně uzavřené dvouřetězcové molekuly DNA. Bakterie se vyskytují ve dvou základních morfologických typech jako koky o velikosti 0,5-1 μm a tyčinky o délce od 1,5 μm , nejčastěji 3 μm a nejdelší dosahují až 50 μm . Velký specifický povrch umožňuje intenzivní metabolickou činnost, tím rychlý růst a množení. Většina bakterií se rozmnožuje dělením. Požadavky bakterií na prostředí jsou značně rozdílné. Podle požadavku na kyslík je lze rozdělit na obligátně aerobní, vyžadující k získání energie vzdušný kyslík, dále fakultativně anaerobní, schopné růst za přítomnosti i nepřítomnosti

kyslíku, obligátně anaerobní, získávající energii fermentací, nebo anaerobní, získávající energii respirací (kyslík je pro ně toxický). Výjimku tvoří aerotolerantní bakterie, schopné množení za přítomnosti kyslíku, mezi které patří i bakterie mléčného kvašení (ŠILHÁNKOVÁ, 2008; KAPRÁLEK, 1986; VLKOVÁ, a další, 2009; HUDECOVÁ, a další, 2009; BEDNÁŘ, a další, 1996).

3.1.1 Růstová křivka bakterií

Samotná bakteriální buňka prochází třemi růstovými stádii: růstem s tvorbou makromolekul a buněčných složek, vytvořením septa a konečným dělením. Profil růstové křivky bakteriální kultury záleží na fyzikálních, chemických a biologických faktorech potřebných k růstu a rozmnožování. Generační doba jednotlivých bakterií se liší. Délku jednotlivých růstových etap bakteriální populace ovlivňuje množství potřebných živin obsažených v médiu. Všeobecně můžeme říci, že jsou čtyři hlavní růstová stadia bakterií (BABÍKOVÁ, 2010; VOTAVA, 2005).

1. Lag fáze – bakterie se adaptují v novém prostředí, syntetizují látky potřebné k růstu a připravují se k rozmnožování.
2. Log (exponenciální) fáze – počet bakterií exponenciálně stoupá (2^n ; n = počet buněk), rychlost množení je maximální.
3. Stacionární fáze – bakterie se už nemnoží, hromadí se metabolity a dochází k vyčerpání živin.
4. Fáze odumírání – bakterie nemají výživu, odumírají a postupně sedimentují (BABÍKOVÁ, 2010)



Obrázek 1 Růstová křivka buněčné kultury (Bacterial growth pl.svg: M.Komorniczak, 2011).

3.2 Bakterie hroznů a vína

Bakterie se vyskytují na hroznech, listech, v půdě, moštu, víně a jsou také rozšířené ve vinařských provozech a prostorách vinného sklepa. Bakterie, které jsou součástí mikroflóry hroznů, moštu a vína, se z technologického hlediska rozdělují na užitečné, které kvalitu vína zlepšují, protože působením jejich činnosti probíhá ve víně malolaktická fermentace (MLF), a naopak nežádoucí bakterie, jejichž vlivem vznikají ve vínech nechtěné mikrobiologické změny, kterých se snaží vinaři vyvarovat (FARKAŠ, 1983). Na hroznech se bakterie vyskytují v koncentraci větší než 10^3 CFU.g⁻¹ a počáteční populace v moštu je velmi nízká. Vzhledem ke kyselým podmínkám pH 3,0-3,5 hroznový mošt poskytuje vhodné přirozené prostředí pouze několika mikrobiálním skupinám (LAFON-LAFOURCADE, a další, 1983).

Rizikovou skupinou jsou octové bakterie, vyžadující pro svůj růst kyslík a teplotní optimum mezi 30°C a 35°C, pod 10°C se téměř nerozmnožují. Vyskytují se na porušených bobulích hroznů, kde vytékající šťáva skýtá optimální podmínky pro množení těchto bakterií. Octové bakterie jsou gramnegativní. Na hroznech, v mošttech a ve vínech se objevuje jen rod *Acetobacter* a rod *Pseudomonas*, který je patogenní, vyskytující se zejména na hroznech napadených plísní *Botrytis cinerea*. Zvláště citlivými odrůdami k napadení octovými bakteriemi jsou moštové odrůdy Müller Thurgau, Veltlínské červené a Modrý Portugal. V moštu z nezdravého, napadeného a poškozeného materiálu mohou octové bakterie na začátku alkoholové fermentace způsobit velkou škodu. Octové bakterie jsou citlivé na SO₂. Obsah SO₂ 25 až 75 mg.kg⁻¹ rmutu octové bakterie značně tlumí v růstu (EDER, a další, 2006; MINÁRIK, a další, 1981).

Bakterie mléčného kvašení, významné při výrobě vína, jsou grampozitivní koky a tyčinky. Ve specifickém prostředí hroznového moštu a vína převažují kmeny, které jsou přizpůsobeny nízkému pH a vysokému obsahu alkoholu. Mošty a vína obsahují striktně heterofermentativní druhy (např. *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus brevis* ad.) a fakultativně heterofermentativní druhy (např. *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus pentosus*). Metabolické činnosti zahrnující odbourávání organických kyselin s pozitivními účinky jsou přisuzovány druhu *Oenococcus oeni*. Bakterie používané pro řízenou MLF patří do rodu *Oenococcus* (KÖNIG, a další, 2009; PAVLOUŠEK, 2010). Homofermentativní bakterie jsou zastoupeny rodem *Pediococcus*,

který zpracovává glukózu nebo fruktózu na kyselinu L nebo DL–mléčnou (FARKAŠ, 1983).

3.3 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (BMK) tvoří skupinu grampozitivních bakterií se společnými morfologickými, metabolickými a fyziologickými vlastnostmi. Klasifikace BMK do různých rodů je z velké části založena na jejich morfologii, způsobu fermentace glukózy, růstu při různých teplotách, dále na konfiguraci produkce kyseliny mléčné, schopnosti růstu ve vysokých koncentracích solí a kyselé nebo alkalické toleranci (SALMINEN, a další, 2004). BMK jsou nesporulující, kataláza-negativní, kyselino-tolerantní, fakultativně anaerobní organismy. Až na několik druhů jsou nepatogenní a pokládány obecně za bezpečné. Rozdělují se na homofermentativní, přeměňující asi 95 % glukózy a jiných sacharidů na kyselinu mléčnou, a heterofermentativní, produkující kyselinu mléčnou, etanol, kyselinu octovou, glycerol a oxid uhličitý (SALMINEN, a další, 2004; MOZZI, a další, 2010). Některé druhy z pyruvátu mohou produkovat při nízké koncentraci substrátu a za striktně anaerobních podmínek kyselinu octovou, etanol a kyselinu mravenčí (KÖNIG, a další, 2009). Z fruktózy vzniká nejčastěji manit, ve víně je málo vhodný. Rozkládat kyselinu jablečnou za vzniku kyseliny mléčné a současného snížení acidity vína umí téměř všechny druhy BMK (MINÁRIK, a další, 1981). Kromě kyseliny mléčné produkuje metabolismus BMK celou řadu sloučenin, např.: diacetyl, 2-3-butandiol, acetoin, široké spektrum těkavých sloučenin a bioaktivní peptidy z katabolismu aminokyselin. Enzymatické reakce (metabolismus) BMK ovlivňují organoleptické, reologické a nutriční vlastnosti fermentovaného výrobku (MOZZI, a další, 2010).

Obecně platí, že se BMK vyskytují na stanovištích s bohatým přísunem výživy. Příkladem takového prostředí jsou rozkládající se rostlinné materiály a ovoce, dále mléčné výrobky, mošty, víno, maso, ryby, kysané zelí, siláž, rostliny, voda, kanalizace, a krom toho se vyskytují v ústech, respiračním traktu a ve střevech člověka a zvířat. Některé druhy jsou aplikovány jako startovací kultury pro potravinářskou fermentaci nebo jsou požívány jako probiotika. V moštu a víně vzhledem ke kyselému prostředí (pH 3,0 až 3,5) nalezneme pouze několik druhů, které jsou tolerantní ke kyselému prostředí. Nepoškozené hrozny obsahují průměrně populaci větší než 10^3 CFU.g⁻¹ mikroorganismů, přičemž hroznový mošt poskytuje vhodné přírodní stanoviště. Mnoho druhů BMK je

inhibováno koncentrací etanolu nad 4 obj. %. Ve víně přežívají tolerantní druhy jako je *Oenococcus oeni*, zatímco z rodů *Lactobacillus* (např. druh *L. hilgardii*), *Leuconostoc*, *Pediococcus* nebo *Weissella* přežívají pouze některé druhy. Bakterie použité během MLF mohou také produkovat několik nežádoucích látek, způsobujících pachutě ve víně. BMK tvoří D (-) nebo L (+) kyselinu mléčnou (KÖNIG, a další, 2009; LAFON-LAFOURCADE, a další, 1983).

Tabulka 1 Bakterie mléčného kvašení izolované z moštu a vína (KÖNIG, a další, 2009).

Rod	Druh
<i>Oenococcus</i>	<i>O. oeni</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. pentosaceus</i> , <i>P. damnosus</i> (<i>P. cerevisiae</i>), <i>P. parvulus</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. cellobiosus</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. trichodes</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. diolivorans</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. kunkeei</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. nagelii</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. vini</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Lc. mesenteroides</i>
<i>Weissella</i>	<i>W. paramesenteroides</i>

Tabulka 2 Klasifikace bakterií mléčného kvašení vyskytujících se v moštu a víně (KÖNIG, a další, 2009).

Rod	Morfologie	Fermentace sacharidů ^{a)}	kyselina mléčná (izomer)
<i>Lactobacillus</i>	Tyčinky, kokobacily, buňky jednotlivě nebo v řetězcích	homo-heterofermentativní, fakultativně heterofermentativní	D, L, DL
<i>Leuconostoc</i>	Kulovité nebo čočkovité buňky v párech nebo řetězcích	heterofermentativní	D
<i>Oenococcus</i>	Kulovité nebo čočkovité buňky v párech nebo řetězcích	heterofermentativní	D
<i>Pediococcus</i>	Kulovité buňky, páry nebo tetrády	homofermentativní, fakultativně heterofermentativní ^{b)}	DL, L
<i>Weissella</i>	Kulovité buňky, páry nebo tetrády	heterofermentativní	D, DL

^{a)} neomezená koncentrace glukózy a růstových faktorů, omezená koncentrace kyslíku.

^{b)} fakultativně heterofermentativní druhy: *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *P. clausenii*.

Pro zpracovávání a přeměnu cukrů (hexóz) používají homofermentativní bakterie mléčného kvašení rodu *Pediococcus* a některé druhy *Lactobacillus* Embden-Meyerhof-

Parnas dráhu (EMP), tím ze zkvasitelných cukrů vzniká pyruvát a ten je následně přeměněn pomocí laktát-dehydrogenázy na kyselinu mléčnou, zatím co heterofermentativní bakterie mléčného kvašení rodu (*Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Oenococcus*) používají k přeměně cukrů (hexóz) Pentózový cyklus (MOZZI, a další, 2010; FERAIN, a další, 1996).

3.3.1 Rod *Lactobacillus*

Z taxonomického hlediska rod *Lactobacillus* zahrnuje 152 popsáných platných druhů. Bakterie rodu *Lactobacillus* představují vysoce rozmanitou skupinu grampozitivních, fakultativně anaerobních a mikroaerofilních nepohyblivých bakterií. Jsou využívány při výrobě potravin. Působí konzervačně, nebo zlepšují chuť, texturu a výživové vlastnosti potravin, ale mohou mít i negativní vliv. Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou acidotolerantní nebo acidofilní a mají složité nutriční požadavky na sacharidy, aminokyseliny, peptidy, estery mastných kyselin, soli, deriváty nukleových kyselin a vitamíny (KLANDER, a další, 1986; CLAEISSON, a další, 2007).



Obrázek 2 *Lactobacillus brevis*

(<http://bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm>, 2012)

Buňky se tvarově liší, tvoří krátké nebo dlouhé štíhlé, někdy ohnuté tyčinky, často i koryneformní koky, spojující se v jednoduché řetězky obvykle pravidelné šířky a délky (0,5-1,2 x 1,0-10,0 μm^{-1}). Růstové rozmezí je mezi teplotami 2 až 53°C, a pH 3 až 8. Optimální hodnoty jsou obvykle 30 až 40°C a pH 5,5 až 6,2 (HEPING, a další, 2014). Tolerance k alkoholu je variabilní. Ve víně byly izolovány heterofermentativní druhy *L. fructivorans*, *L. brevis* a *L. hilgardii*, které snášely 16 až 20 obj. % etanolu, zato homofermentativní druh *L. plantárum* je tolerantní méně, snáší obsah etanolu do 6 obj. %. Přítomnost SO_2 nad 40 mg.l^{-1} silně omezuje růst bakterií a 50 až 100 mg.l^{-1} kombinovaného SO_2 je schopno zcela inhibovat růst bakterií (KÖNIG, a další, 2009; RIBÉREAU-GAYON, a další, 2006). Produkty metabolismu glukózy bakterií rodu *Lactobacillus*, jsou u homofermentativních druhů hlavně kyselina mléčná a u heterofermentativních druhů kyselina mléčná, kyselina octová, etanol a CO_2 . Z glycerolu a fruktózy tvoří manit. Působením bakterií druhu *L. plantárum* a *L. brevis* může

nastat rozklad kyselin vinné na CO₂, kyselinu octovou, kyselinu mléčnou a kyselinu jantarovou (FARKAŠ, 1983; MINÁRIK, a další, 1981).

3.3.2 Rod *Leuconostoc*

Rod *Leuconostoc* obsahuje třináct uznávaných druhů. Rod *Leuconostoc* jsou grampozitivní, heterofermentativní, nepohyblivé, asporogenní, fakultativně anaerobní, elipsoidní až sférické často protáhlé buňky uspořádané do párů nebo řetízků (HEPING, a další, 2014; HOLZAPFEL, 1992). Všechny druhy vyžadují médium bohaté na živiny s komplexním obsahem růstových faktorů a aminokyselin. Optimální růst je při pH 5 – 7 a teploty 20–30 °C, minimální růst je pro většinu 5 °C. Při koncentraci nad 10 obj. % etanolu nerostou. Inkubační doba pro dosažení dobrého růstu se pohybuje v rozmezí 24 až 48 hodin. Za mikroaerofilních podmínek převádí glukózu na kyselinu D-mléčnou, etanol a CO₂ za použití kombinace hexózo-monofosfátových a pentózových drah. Za přítomnosti kyslíku místo etanolu produkují kyselinu octovou. Během malolaktické fermentace degradují malát na kyselinu L-mléčnou a CO₂ (DELLAGLIO, a další, 1995; KÖNIG, a další, 2009). Mohou mít vliv na organoleptické vlastnosti vína. Druh izolovaný z hroznového moštu byl *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* a to při alkoholové fermentaci (KÖNIG, a další, 2009).

3.3.3 Rod *Oenococcus*

Rod *Oenococcus* byl oddělen od rodu *Leuconostoc* a obsahuje pouze dva druhy *Oenococcus oeni* a *Oenococcus kitahareae*. Rod *Oenococcus* jsou grampozitivní, nepohyblivé, fakultativně anaerobní, kataláza-negativní, elipsoidní sférické buňky, vyskytující se obvykle v párech nebo řetízcích. Tento rod je heterofermentativní, zpracovávající glukózu na kyselinu D-mléčnou, CO₂, etanol a kyselinu octovou. (http://bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm, 2012)



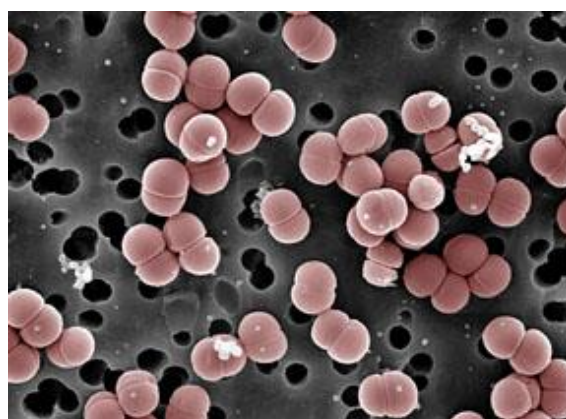
Obrázek 3 *Oenococcus oeni*

Druh *Oenococcus oeni* může provádět malolaktickou fermentaci, kterou lze nalézt rovněž u rodů *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Pediococcus* (KÖNIG, a další, 2009). Nutriční požadavky *Oenococcus oeni* vyžadují

komplex aminokyselin jako celek (alanin, arginin, cystein, kyselinu glutamovou, histidin, leucin, fenylalanin, serin, tryptofan, tyrozin a valin), vitamíny skupiny B, minerály (Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Na^+), organické kyseliny a cukry. Optimální teplota růstu pro druh *Oenococcus oeni* je od 27 do 30 °C v přítomnosti alkoholu, ale zejména ve víně se omezuje k hodnotám od 18 do 23 °C. V praxi se nejčastěji udržuje teplota vína při malolaktické fermentaci co nejbližší 20 °C, protože teploty 25 °C a vyšší stupňují riziko tvorby těkavých kyselin. Teploty pod 15 °C metabolismus bakterií zpomalují, ale nezastavují. Co se týče alkoholu, rostou bakterie rodu *Oenococcus* aktivně až do obsahu 13–14 obj. % etanolu, pak se růst zpomaluje, některé druhy však snášejí až 16 obj. % etanolu. Hodnota pH 3,8 je optimální pro nejrychlejší růst, přičemž pro provedení malolaktické fermentace je dobré mít hodnoty v rozmezí pH 3,0–3,3. Pokud se pohybuje pod pH 3,0, je růst bakterií silně inhibován (RIBÉREAU-GAYON, a další, 2006). Odolnost druhu *Oenococcus oeni* vůči SO_2 je variabilní, protože je schopen rozvíjet toleranci k SO_2 a má vždy přímou souvislost s hodnotou pH. Koncentrace 10 mg.l^{-1} volného nebo 30 mg.l^{-1} veškerého SO_2 tlumí růst bakterií a obsah nad 30 mg.l^{-1} volného nebo $50\text{--}100 \text{ mg.l}^{-1}$ celkové SO_2 růst zcela inhibuje (KÖNIG, a další, 2009; EDER, a další, 2006). *Oenococcus oeni* může metabolizovat acetaldehyd za vzniku etanolu a kyseliny octové, produkce diacetylu je relativně na nízké úrovni (FUGELSANG, a další, 2007).

3.3.4 Rod *Pediococcus*

Rod *Pediococcus* zahrnuje 11 popsáných platných druhů, nevykazujících patogenitu k rostlinám a zvířatům. Bakterie rodu *Pediococcus* jsou grampozitivní, kataláza- a oxidáza-negativní, chemoorganotrofní, fakultativně aerobně mikroaerofilní, homofermentativní mikroorganismy. Buňky mají kulovitý, málokdy vejčitý tvar o velikosti 0,36 až $1,43 \mu\text{m}^{-1}$. Buněčné dělení probíhá ve dvou směrech



Obrázek 4 *Pediococcus pentosaceus*

(<http://bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm>, 2012)

a jedné rovině za vzniku tetrad, netvoří řetězky a tím se liší od ostatních bakterií mléčného

kvašení. Bakterie rodu *Pediococcus* se vyskytují v rostlinných materiálech, ovoci a fermentovaných potravinách a nutričně vyžadují komplexnost růstových faktorů a aminokyselin (HEPING, a další, 2014).

Ve víně a moštu se vyskytují jenom čtyři druhy *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus*, *P. pentosaceus*. Všechny druhy izolované z vína rostou jen za přítomnosti sacharidů, z kterých využívají hexózy, pentózy, disacharidy, trisacharidy a polymery, jako je škrob (FUGELSANG, a další, 2007). Rod *Pediococcus* roste při různých hodnotách pH 4,5-7,0 a snáší teploty až do 45 °C. Druh *P. damnosus* prosperuje do teploty 35 °C, snese až 12 % obj. etanolu a jeho výskyt byl prokázán ve vínech obsahujících 50 mg.l⁻¹ volného SO₂ (KÖNIG, a další, 2009; RIBÉREAU-GAYON, a další, 2006). Glukózu fermentují pomocí Embden-Meyerhof-Parnasové dráhy na kyselinu L nebo DL–mléčnou. Druh *P. pentosaceus* degraduje glycerol na pyruvát, ten může být metabolizován buď na acetát nebo diacetyl a dále 2,3-butandiol. Pyruvát může být druhem *P. damnosus* převeden na acetoin a diacetyl. Obecně platí, že rod *Pediococcus* je ve víně nežádoucí z důsledku tvorby nadměrného množství diacetylu, nežádoucích pachů a biogenních aminů. Některé druhy jsou schopny degradovat glycerol na akrolein, který reaguje s antokyany a vytváří hořkou chuť (FUGELSANG, a další, 2007). Druh *P. damnosus* umí přeměnit cukry na polysacharidy, které zvyšují viskozitu. Tento efekt pak nazýváme vláčkovatění (EDER, a další, 2006).

3.3.5 Rod *Weissela*

Rod *Weissela* byl poprvé navržen v roce 1993, druhy tohoto rodu byly dříve zařazeny pod rody *Lactobacillus* a *Leuconostoc*. V současnosti tento rod obsahuje osmnáct popsaných platných druhů. Rod *Weissela* jsou grampozitivní, nesporulující, heterofermentativní, obvykle nepohyblivé bakterie. Tvoří asporogenní krátké tyčinky, na jednom konci zúžené a zaoblené, nebo jsou vejčité. Rostou samostatně, v párech, nebo tvoří řetízky. Rod *Weissela* dobře roste při teplotě 15 °C, optimum je 42-45 °C (HEPING, a další, 2014). Ve víně se vyskytuje pouze druh *Weissela Paramesenteroides*, která z glukózy vytváří kyselinu D-mléčnou (KÖNIG, a další, 2009).

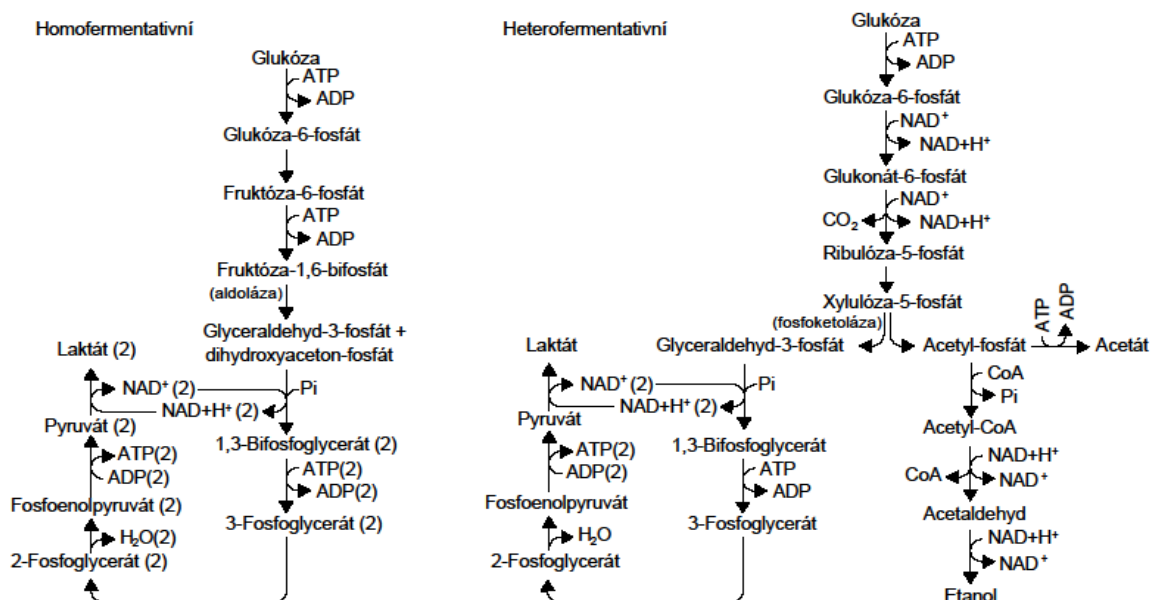
3.4 Metabolismus

Enzymatické reakce a metabolismus BMK ovlivňují organoleptické, reologické a nutriční vlastnosti potravin a vína. BMK jsou fermentační, účinně využívají látky k výživě a metabolizují je na jiné látky (MOZZI, a další, 2010).

3.4.1 Glukóza

BMK využívají glukózu za vzniku kyseliny mléčné, a to homo- nebo heterofermentativní cestou. Homofermentativní bakterie (např. *P. damnosus*, *P. parvulus*, *L. plantárum*, *ad.*) transformují glukózu na pyruvát Embden-Meyerhof-Parnas dráhou (EMP) a působením laktát-dehydrogenázy z pyruvátu, následovně vzniká D- nebo L- kyselina mléčná, nebo kombinace DL- kyseliny mléčné. Z jednoho molu glukózy vznikne asi 1,8 molu kyseliny mléčné a energetický výnos je dva moly ATP na jeden mol glukózy. Diagnostickým enzymem přítomným u mikroorganismů, disponujících touto dráhou, je aldoláza katalyzující jeden mol fruktózy-1,6-bifosfátu na dva moly glyceraldehyd-3-fosfátu (GOTTSHALK, 1986; FUGELANG, a další, 2007).

Obligátně heterofermentativní (např. *O. oeni*, *L. brevis*, *L. hilgardii* a *L. fructivorans*...) postrádají aldolázy, a proto musí použít pentózofosfátové nebo

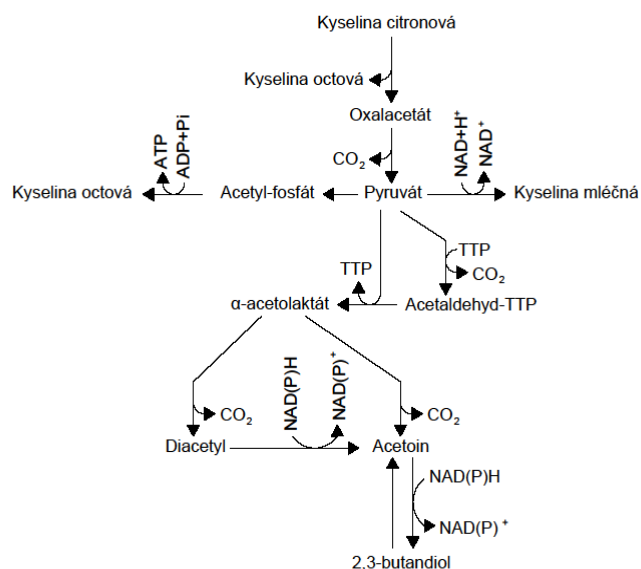


Obrázek 5 Metabolismus glukózy homo- nebo heterofermentativní cestou bakteriemi mléčného kvašení (FUGELANG, a další, 2007).

fosfoketolázové dráhy. Fosfoketoláza je enzym zodpovědný za štěpení xyluloza-5-fosfátu na glycerinaldehyd-3-fosfát a acetyl fosfát. Vzhledem k biosyntéze v této dráze mohou některé druhy BMK využívat pentózy nacházející se ve víně (např. ribózu, xylózu a arabinózu). Z jednoho molu glukózy tyto bakterie produkují jeden mol kyseliny mléčné, CO₂, a buď kyselinu octovou, nebo etanol. Ve skutečnosti však produkují z jednoho molu glukózy 0,8 molu kyseliny mléčné. Energetický zisk z jednoho molu glukózy při přeměně na kyselinu mléčnou je jeden mol ATP a další jeden mol ATP lze získat přeměnou acetyl-fosfátu na acetát. Ve vinařství je důležité řízení procesů těchto BMK, kde i za malých oxidativních podmínek je zvýšené riziko produkce těkavých kyselin. Za reduktivních podmínek se acetyl-fosfát spíše převádí na etanol než na acetát (FUGELSANG, a další, 2007; GOTTSALK, 1986).

3.4.2 Kyselina citronová

Některé heterofermentativní a homofermentativní BMK degradují kyselinu citronovou. Mezi druhy nalezené ve víně patří *L. plantarum*, *L. casei*, *O. oeni* a *L. mesenteroides*. Ty jsou schopny rychle použít kyselinu citronovou. Kmeny rodu *Pediococcus* a druhy *L. hilgardii* a *L. brevis* kyselinu citronovou nedegradují. Při degradaci je nejprve kyselina citronová pomocí enzymu lyázy rozdělena na kyselinu octovou a oxalacetát, který se následně dekarboxyluje na pyruvát. Pyruvát

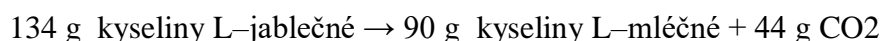
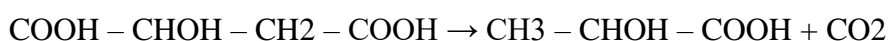


Obrázek 6 Metabolismus kyseliny citronové (FUGELSANG, a další, 2007).

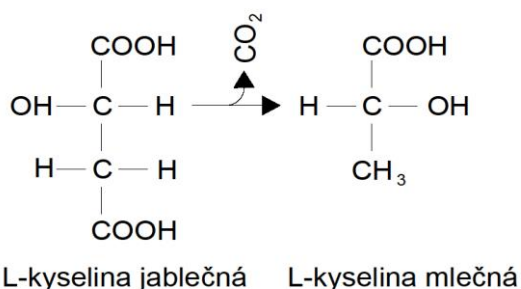
podstupuje další dekarboxylaci a kondenzaci s thiaminpyrofosfátem (TPP) za získání „aktivního acetaldehydu“. Následnou reakcí s jinou molekulou pyruvátu vzniká α-acetolaktát, který podle pořadí podléhá oxidativní dekarboxylaci za vzniku diacetylu. Diacetyl může být dále transformován na acetoin, nebo 2,3-butandiol (FUGELSANG, a další, 2007; RIBÉREAU-GAYON, a další, 2006).

3.4.3 Transformace kyseliny jablečné

Transformace kyseliny jablečné je jediná reakce u bakterií mléčného kvašení, která se podílí na výrobě vína. Při studiu heterofermentativního rodu *Oenococcus* bylo zjištěno, že z glukózy tvoří výhradně kyselinu D-mléčnou a z kyseliny jablečné kyselinu L-mléčnou. Dekarboxylace kyseliny jablečné probíhá přímo (FUGELSANG, a další, 2007).



MLF aktivita bakterií ve víně závisí na koncentraci a aktivitě specifického proteinu, ale i na integritě buněk. Reakce probíhá uvnitř buňky v optimálním prostředí, chráněná před mnoha inhibitory ve víně. Jakékoliv poškození membrány snižuje činnost celé buňky. Klíčovým faktorem je optimální hodnota pH (MINÁRIK, a další, 1981; REYNOLDS, 2010).



Obrázek 7 Dekarboxylace kyseliny jablečné (FUGELSANG, a další, 2007).

3.5 Malolaktická fermentace (MLF)

Degradaci kyseliny jablečné dochází k jablečno-mléčné fermentaci, MLF u bílých a především červených vín. Cílem je snížení obsahu chuťově neatraktivní kyseliny L-jablečné přeměnou na harmonickou a chuťově příjemnější kyselinu mléčnou. Proces přispívá k celkové mikrobiální stabilitě vína snížením zdrojů uhlíku k výživě bakterií (PAVLOUŠEK, 2010). V závislosti na moštové odrůdě, regionu, nebo zralosti hroznů MLF dokáže degradovat od 1,5 až do 8 g.l⁻¹ kyseliny L-jablečné. V praxi MLF vyžaduje značnou biomasu životaschopných bakterií, převyšující hraniční hodnotou populace 10⁶ CFU.ml⁻¹. MLF se většinou provádí řízeně po alkoholové fermentaci za inokulace bakterií druhu *Oenococcus oeni*. Inokulaci bakterií taktéž lze provést na začátku spolu s kvasinkami nebo v průběhu alkoholové fermentace (AF). Spontánní MLF je z hlediska

kontroly průběhu procesu a výsledných produktů náročná a značně riziková. Je nutné provádět senzorické hodnocení, laboratorní rozborů před, v průběhu i po MLF a při jakémkoli podezření, že se MLF ubírá špatným směrem, ukončit proces přidávkou SO_2 . Vínář potřebuje mít kontrolu nad vývojem mikrobiální biomasy, tak aby se zajistilo úplné proběhnutí MLF, aby se vyvaroval vývojových poruch *Oenococcus oeni* a spolehlivě zabránil znehodnocení vína. Faktory působící na zdárný průběh MLF jsou hodnota pH, teplota, etanol, obsah SO_2 a komplexní výživa pro růst bakteriální populace (REYNOLDS, 2010). Pro úspěšné zahájení MLF je nutné vytvořit následující podmínky: hodnota nad pH 3,1; teplota aspoň 18 °C, žádný volný SO_2 , maximálně 50 mg.l⁻¹ vázaného SO_2 ; zbytkový cukr pod 20g.l⁻¹; víno ponechat v lehce kalném stavu, nebo na jemných kvasničných kalech (STEIDL, a další, 2006). MLF působí na celkový aromatický profil vína a do značné míry jej probíhajícími reakcemi dokáže podpořit nebo znehodnotit. Po ukončení MLF se doporučuje víno ještě ponechat na jemných kvasničných kalech, které se pravidelně promíchávají. Kvasniční kaly dokáží ve víně redukovat obsah diacetylu a máselné tóny ve vůni (REYNOLDS, 2010; PAVLOUŠEK, 2010).

3.5.1 Výživa

Po ukončení alkoholové fermentace mohou ve víně zůstat nízké koncentrace hexóz, mezi něž patří glukóza, fruktóza a menší množství manózy a galaktózy. Z pentóz jsou nejběžnější arabinóza, ribóza a xylóza. Dostačující množství podporující růst mléčných bakterií ve víně (FUGELSANG, a další, 2007). Energie získaná fermentací zbytkového cukru postačuje k zajištění nezbytného růstu bakterií pro úspěšné spuštění a dokončení MLF. K pokrytí potřeb postačuje méně než 1 g.l⁻¹ glukózy, protože jsou použity i jiné cukry v médiu. Druh *Oenococcus oeni* je náročný z hlediska kvality zdroje dusíku. kAminokyseliny podporující růst *Oenococcus oeni* jsou arginin, kyselina glutamová, histidin, izoleucin, leucin, metionin, fenylalanin, serin, tyrozin a valin. Bylo zjištěno, že růstový výtěžek *Oenococcus oeni* v nepřítomnosti leucinu, fenylalaninu nebo kyseliny glutamové byl mnohem nižší než v přítomnosti těchto aminokyselin. Absenci volných aminokyselin lze určitým způsobem nahradit specifickými peptidy. Dalším důležitým prvkem růstu bakteriální kultury jsou vitamíny skupiny B, minerály (Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Na^+) a organické kyseliny (RIBÉREAU-GAYON, a další, 2006; RITT, 2007). Mléčné bakterie využívají především uvolněné látky z odumřelých buněk kvasinek. Jemné kaly

po odstranění hrubého sedimentu poskytují dostatek živin pro růst bakteriální populace (EDER, a další, 2006). Autolýzou kvasinek se uvolňují glukany a mannoproteiny a upravuje se obsah aminokyselin, peptidů a bílkovin. Mannoproteiny poutají toxické mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem, nebo enzymatickou hydrolyzou vytváří živiny a stimulují růst bakterií (PAVLOUŠEK, 2010). Špatné nutriční podmínky a omezený obsah aminokyselin má významný inhibiční účinek na maximální rychlost růstu a produkci biomasy druhu *Oenococcus oeni*. Pro zlepšení výživových podmínek u problematických vín je nutné dodat výživu. Výživové přípravky jsou většinou kombinací buněčných stěn kvasinek, kaseinů a buničiny. Při inokulaci bakterií na začátku alkoholové fermentace spolu s kvasinkami je potřeba uvažovat o přidání komplexní výživy. *Oenococcus oeni* je za špatných nutričních podmínek schopen použít dikarboxylovou kyselinu jako biosyntetický prekursor nezbytné syntézy aminokyselin pro dosažení maximální rychlosti růstu a produkce biomasy (SAGUIR, a další, 2002; www.lipera.cz, 2015).

3.5.2 Stresové faktory

Hodnota pH moštu a vína se pohybuje velmi nízko, protože obsahuje kyseliny, které jsou běžně kolem pH 3,0 až 3,4. Pokud jsou hodnoty nad pH 3,5, je velké riziko rozmnožení nežádoucích bakterií (např. *Pediococcus damnosus*) a s tím spojená tvorba nežádoucích kontaminantů. Ideální pro dobré provedení MLF je rozmezí pH 3,3–3,4. *Oenococcus oeni* je schopen dobrého růstu a ostatní bakterie jsou relativně inhibovány. Pokud pH dosahuje nízkých hodnot, doporučuje se při hodnotách pod pH 2,9 provést chemické odkyselení k dosažení potřebných parametrů (EDER, a další, 2006; RIBÉREAU-GAYON, a další, 2006). Z vlastního průzkumu většina výrobců komerčních kmenů bakterií *Oenococcus oeni* uvádí minimální pH 2,9 až do pH 3,3. Při hodnotách pH 3,0–3,2 je růst *Oenococcus oeni* náročnější z hlediska většího vlivu stresových faktorů.

Pokud jsou všechny ostatní hodnoty dobré, MLF je rychlejší při vyšším pH. Například MLF trvala až 160 dní u vína s pH 3,1 a 14 dní u vín s pH 3,8 (BOUSBOURAS, a další, 1971).

Obsah SO₂ mléčné bakterie značně tlumí. Při plánované MLF je přídavek SO₂ v průběhu zpracování hroznů nežádoucí. Obsah volného SO₂ 10 mg.l⁻¹ nebo celkového SO₂ 30 mg.l⁻¹ mléčné bakterie ještě tolerují a prosperují. V průměru volný SO₂ 30 mg.l⁻¹

a celkový SO_2 nad 50 mg.l^{-1} až na pár výjimek (kmenů *Oenococcus oeni*) je pro mléčné bakterie zcela inhibiční. Některé komerční selektované kmeny *Oenococcus oeni* snáší až 35 mg.l^{-1} volného SO_2 a celkové SO_2 až do 70 mg.l^{-1} (EDER, a další, 2006; www.lipera.cz, 2015).

Teplota je nejnáze kontrolovatelná a udržitelná hodnota MLF díky regulaci ohřevem nebo chlazením. V laboratorních podmínkách je ideální teplota živného média MLF $27\text{--}30 \text{ }^\circ\text{C}$. Pro dobrý začátek a průběh MLF ve víně jsou ideální teploty 20 až $22 \text{ }^\circ\text{C}$ vzhledem k chemickému složení média, působení etanolu na plazmatickou membránu a taktéž vlivem teploty na tekutost a aktivitu membrán. Nízké teploty zpožďují nástup MLF a v průběhu může docházet ke komplikacím. Pokud MLF začala a je vytvořen dostatek biomasy, nemají teploty 18 až $19 \text{ }^\circ\text{C}$ dále vliv na průběh MLF a jen ji zpomalují. Doporučuje se udržovat teplotu kolem $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (REYNOLDS, 2010; EDER, a další, 2006).

Etanol – BMK jsou citlivé na etanol. Tolerance se liší podle rodu, druhu a kmene. Heterofermentativní druhy *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus hilgardii* jsou často izolovány ve vínech s obsahem etanolu 16 až 20 obj. %. *Pediococcus damnosus* snáší 10 až 12 obj. % etanolu. *Oenococcus oeni* se aktivuje při 6 až 8 obj. % etanolu a obtížné růstové podmínky pro něj nastávají až nad hranicí 14 obj. % etanolu (RIBÉREAU-GAYON, a další, 2006). Na základě průzkumu trhu některé selektované kmeny bakterií *Oenococcus oeni* dokáží odolávat i 16 obj. % etanolu. Proto je důležité zvážit a zvolit vhodný kmen *Oenococcus oeni*, který provede ve víně MLF, tak aby dobře prosperoval, rychle odboural kyselinu jablečnou bez vedlejších produktů a zvýšil kvalitu výsledného produktu.

Lysozym je enzym s antimikrobiální aktivitou, vyznačující se schopností poškozovat buněčné stěny bakterií. Používá se k rozbití bakteriálních buněčných stěn. Enzym působí tak, že katalyzuje hydrolyzou 1,4-beta vazby mezi kyselinou N-acetylmuramovou a N-acetyl-D-glukosaminem v peptidoglykanu a mezi N-acetyl-D-glukosaminem v cyklodextrinu (www.thermofisher.com, 2015). Ve vinařství se enzym používá ke kontrole a zamezení nechtěného rozvoje bakterií po AF a zpomalení nebo zastavení MLF. Přídavkem lysozymu dochází k odumírání BMK. Na kvasinky a octové bakterie lysozym nemá téměř žádný účinek. U červených vín vlivem lysozymu dochází ke ztrátě barvy a u bílých vín je problém s nestabilní bílkovinou. Víno je nutné po použití lysozymu před lahvováním filtrovat a stabilizovat bílkovinu (například použitím

bentonitu). Doporučené dávkování pro bílá vína je 0,15 g.l⁻¹ a červená 0,20 až 0,30 g.l⁻¹. Zákonné povolené maximální dávkování v EU do vína je 0,5 g.l⁻¹ a doba působení ve víně je asi 25–45 dní (www.lipera.cz, 2015).

3.5.3 Stresové mechanismy související s adaptací *Oenococcus oeni* ve víně

Víno je nepříznivé prostředí pro *Oenococcus oeni*. Etanol, nízké pH, málo živin a přítomnost fenolických a jiných inhibujících sloučenin činí růst buněk a přežití obtížné. *Oenococcus oeni* musí spouštět různé adaptivní stresové mechanismy, protože zpoždění nebo zastavení MLF ohrožuje kvalitu vína (GARCÍA-RUIZ, a další, 2011). Několik těchto mechanismů přispívá k přežití *Oenococcus oeni* ve víně. Hlavními mechanismy jsou výroba protonů prostřednictvím aktivace membránových vázaných ATPáz, syntéza stresových bílkovin a modifikace buněčné membrány. Nízké pH vína způsobuje intracelulární okyselení *Oenococcus oeni*, které negativně ovlivňuje funkci buňky. Kromě toho, etanol zvyšuje permeabilitu membrány posílením vnitřního okyselení (DESENS, a další, 1988). Spotřeba kyseliny jablečné přispívá k přežití *Oenococcus oeni* ve víně generováním hybné síly protonů, která vede k produkci ATP. Nicméně, ATPázy samy o sobě mohou být inhibovány různými stresovými sloučeninami, jako je například SO₂. Na druhé straně, vytlačování protonů ven z buňky pomáhá udržovat intracelulární homeostázy. Další biochemické transformace, jako je například spotřeba kyseliny citronové, může také aktivovat ATPázy vázané na membránu. Metabolismus kyseliny citronové spotřebovává protony a vytváří membránový potenciál a pH gradient, což umožňuje syntézu ATP. Aktivace metabolické dráhy kyseliny citronové bylo spojeno s možnou odpovědí na stres různých kmenů *Oenococcus oeni* (LOUIBERE, a další, 1992). Bakteriální buňky vykazují rovněž zvýšenou syntézu Lo18 (proteinu tepelného šoku, vyznačujícího se chaperonového činností), který zamezuje nevratné denaturaci bílkovin. Bakterie *Oenococcus oeni* mobilizuje jako odpověď na stres na membránu protein Lo18, což umožňuje zachování její integrity za stresových podmínek a tím větší schopnost přežití bakterie ve víně a provedení MLF (MAITRE, a další, 2012). *Oenococcus oeni* používá ještě mnoho dalších stresových proteinů, které hrají důležitou roli v reakcích na stres (RAI, a další, 2015).

3.5.4 Vzájemné působení (interakce) mezi mikroorganismy MLF

Vzájemné vztahy mezi **kvasinkami a bakteriemi** v průběhu alkoholové fermentace a MLF mají zásadní vliv na kvalitu konečného produktu. Ve složitých podmínkách moštu a vína mikroorganismy soupeří o substrát. Kvasinky jsou dobře přizpůsobeny k růstu v hroznovém moštu. V prvních dnech AF se mnohem rychleji zvětšuje populace kvasinek než mléčných bakterií (MB), i když jsou naočkovány současně v životaschopných populacích. Kvasinky jsou vždy dominantní nad mléčnými bakteriemi. Během rychlého růstu na počátku AF kvasinky čerpají aminokyseliny, kdy některé mohou být zcela spotřebovány (např. Arginin, aj.). Nedostatek aminokyselin v kombinaci s produkcí toxických metabolitů kvasinkami (etanol, SO₂) brání v růstu bakteriální populace. Mastné kyseliny vylučované kvasinkami (k. hexanová, oktanová, dekanová a zejména k. dodekanová) působí negativně na bakteriální membránu. Přítomnost těchto kyselin má za následek vylučování ATP a ztrátu schopnosti degradace kyseliny jablečné bakteriemi. Mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem (C6 až C12), vyprodukované metabolismem kvasinek během alkoholové fermentace působí inhibičně na růst *Oenococcus oeni* a jejich schopnost rozkládat kyselinu L-jablečnou. Ve víně jsou při pH 3,0 převážně mastné kyseliny v nedisociované formě, které mají vyšší inhibiční účinek (CAPUCHO, a další, 1994; RIBÉREAU-GAYON, a další, 2006). Nedisociovaná forma volných mastných kyselin je toxická pro buňky, protože je vysoce rozpustná v membránových fosfolipidech, a buňky tak mohou proniknout do cytosolu pasivní difuzí. Carreté, Vidal, Bordons a Constantí (2002) prokázali synergický inhibiční účinek na růst a ATPázy, když byly buňky *Oenococcus oeni* vystaveny účinkům mastných kyselin (C10 a C12) a etanolu (CARRETÉ, a další, 2002). V konečné (stacionární) fázi alkoholové fermentace kvasinky naopak růst bakterií stimulují. Glukosidáza a bakteriální proteázy jsou zodpovědné za hydrolýzu buněčné stěny kvasinek a vedou k lýze celé kvasinkové buňky. Autolytickou činností kvasinkových buněk se uvolňují důležité komponenty (vitamíny, dusíkaté báze, peptidy a aminokyseliny), působící jako růstové faktory bakterie. Bakteriální populace roste, inhibuje kvasinky a způsobuje urychlení fáze smrti kvasinek. Podmínky prostředí, zejména pH a SO₂, hrají důležitou roli ve vývoji smíšených kultur kvasinek a bakterií (RIBÉREAU-GAYON, a další, 2006).

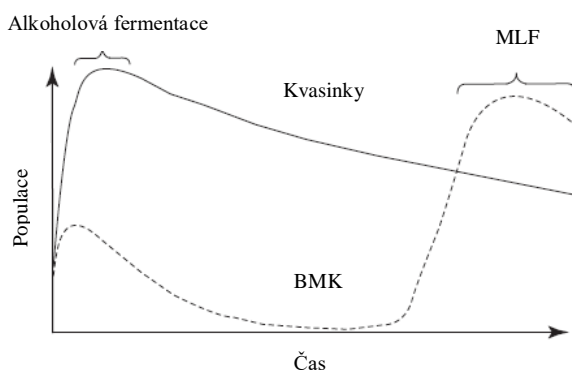
Interakce mezi bakteriemi probíhá stejně jako u ostatních mikroorganismů, které mohou syntetizovat a produkovat látky s antimikrobiální aktivitou. U bakterií mohou být

tyto látky jednoduché (peroxid vodíku, organické kyseliny, ...), nebo složitější bakteriociny (proteiny s baktericidní aktivitou). Každý bakteriální kmen tvoří specifický bakteriocin s úzkým polem působení. Druh *Lactobacillus brevis* produkuje brevicin, malý termostabilní protein s velkým rozsahem účinku, inhibující kmeny druhů *Oenococcus oeni*, *Pediococcus damnosus* a taktéž *Lactobacillus brevis*. Brevicin působí v širokém rozmezí pH 1-9. Druh *Lactobacillus casei* produkuje caseicin, méně termostabilní protein s mnohem vyšší molekulární hmotností, který je aktivní pouze na kmeny *Lactobacillus casei*. Druh *Lactobacillus plantarum* vykazuje antibakteriální aktivitu vůči mnoha bakteriálním druhům produkcí bakteriocinu plantaricin D, který je zejména účinný k druhu *Oenococcus oeni*. MB druhu *Pediococcus pentosaceus* produkuje baktericidní protein vis à vis ve velkých množstvích, který je stabilní v kyselém prostředí moštu a vína s koncentrací etanolu. Nejviditelnější bakteriocidní působení k druhu *Oenococcus oeni* bylo zaznamenáno od druhů *Pediococcus pentosaceus* a *Lactobacillus plantarum*. Inhibiční působení těchto druhů je patrné jen ve smíšených kulturách s druhem *Oenococcus oeni*, anebo když je médium předem fermentováno těmito dvěma druhy a následně je inokulován kmen druhu *Oenococcus oeni* (RIBÉREAU-GAYON, a další, 2006; LONVAUD-FUNEL, a další, 1993).

3.5.5 Spontánní MLF

Když je alkoholová fermentace dokončena, populace bakterií *Oenococcus oeni* ve víně je 10^3 - 10^4 CFU.ml⁻¹. Tato bakteriální populace je menší u vín s nízkým pH, nebo s vysokou koncentrací alkoholu. Naproti tomu při vysokém pH se bakterie množí během posledních několika dní alkoholové fermentace nebo v období po fermentaci. V tomto případě MLF začne rychle.

Obecně platí, že uplyne několik dní až týdnů mezi koncem alkoholové fermentace a MLF, která nastane, až bakterie dosáhnou koncentrace 10^6 CFU.ml⁻¹. Víno musí být udržováno při teplotách nejbližší 20 °C a to je vzhledem k délce trvání nákladné. V případě, že se



Graf 1 Obecný vývoj populace kvasinek a BMK v průběhu fermentace (REYNOLDS, 2010).

bakterie *Oenococcus oeni* nedokážou množit, mohou se rozvíjet bakterie (*Pediococcus*, *Lactobacillus*, ...), nebo kvasinky (*Brettanomyces bruxellensis*) s ničivými účinky. V případě, že se proces nespustí spontánně, přidáním bakteriální kultury se zabrání vývoji nežádoucích mikroorganismů (REYNOLDS, 2010; RIBÉREAU-GAYON, a další, 2006). Deštivé a chladné počasí, napadení hroznů houbovými chorobami při dozrávání negativně působí na vývoj spontánní mikroflóry. U nedostatečně kontrolované a neřízené MLF se spontánní kulturou bakterie *Oenococcus oeni* je zvýšené riziko tvorby negativních sensoricky aktivních látek (PAVLOUŠEK, 2010). Je nutné dodržet výživové podmínky bakterií uvedené v kapitole (3.5.1 Výživa), průběžné sensorické hodnocení probíhající MLF a provádění laboratorních rozborů. Tento způsob aplikace MLF je energeticky a časově náročný.

3.5.6 Inokulace

Většina startovacích kultur MLF obsahuje kmeny druhu *Oenococcus oeni*, výjimečně kmeny druhu *Lactobacillus plantarum* (např. Viniflora® plantarum od výrobce Chr. Hansen A/S). I přesto, že se MLF ve vínech spustí spontánně, jakékoli zpoždění může vést ke změně kvality vína. Z tohoto důvodu většina středních a velkých vinařství preferují stále více přímou inokulaci vína startovacími kulturami bakterií. Nicméně provedení MLF inokulací komerčně dostupnými kmeny *Oenococcus oeni* není vždy úspěšné, protože víno je velmi drsné prostředí pro růst bakterií. Výběr vhodných kmenů bakterií pro naočkování vína se obvykle provádí klasickými zkouškami v podstatě založenými na přežití ve víně a sledování spotřeby kyseliny L-jablečné. Kritéria, které je třeba vzít v úvahu při vývoji bakteriálních kultur, zahrnují rezistenci na etanol a SO₂, odolnost vůči bakteriofágům, schopnost růstu při nízkém pH, zdravotní riziko pro konečného spotřebitele a odolnost vůči technologickému stresu. Výběr kmenů s minimální produkcí diacetylu z metabolismu kyseliny citronové může být založen na měření enzymatické aktivity a současně expresi genů podílejících se na metabolismu kyseliny citronové. Stresové geny druhu *Oenococcus oeni*, vztahující se k adaptaci ve víně, jsou dobrými markery za účelem selekce nových odolnějších kmenů. Pozor, i ty nejodolnější kmeny vyžadují intenzivní péči. Adekvátní skladování a očkovací protokoly jsou nezbytné pro zajištění životaschopnosti vybraných kmenů bakterií a započetí MLF. Je rovněž důležité sledovat vývoj jednotlivých etap po inokulaci. Dominance startovací

bakteriální kultury nad domácí bakteriální kulturou by měla být ověřována po celou dobu trvání MLF (RAI, a další, 2015; HENICK-KLING, 1995; TORRIANI, a další, 2011).

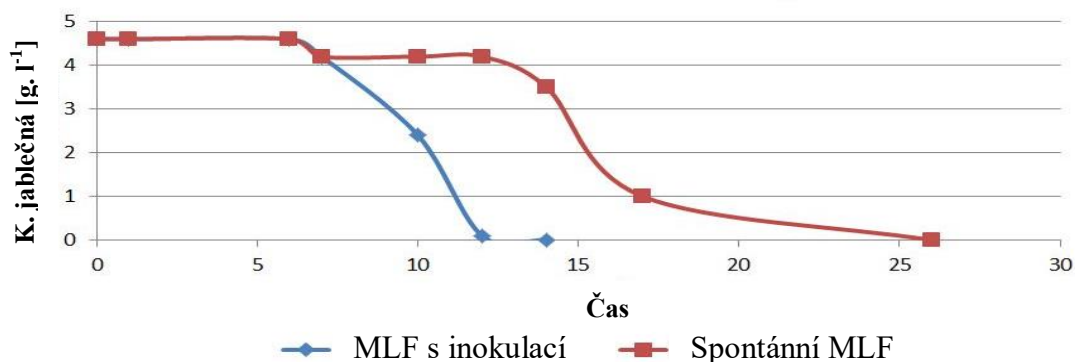
Bakteriální preparáty se připravují tak, aby měly vysokou výkonnost biomasy a minimální náklady na přípravu. Buňky se oddělí a zahustí odstředěním, potom proběhne lyofilizace nebo zmrazení. Většina přípravků je lyofilizována, což je nejúčinnější způsob, jak zachovat životaschopnost po dobu několika měsíců a který také usnadňuje manipulaci s přípravkem. Bakterie jsou baleny v sáčcích, které obsahují potřebné množství k naočkování vína v objemech od 250 l až 25 000 l (REYNOLDS, 2010).

Tabulka 3 Enologické pokyny pro výběr startovacích komerčních kultur bakterií MLF (TORRIANI, a další, 2011).

Kategorie	Vlastnosti
Odolnost vůči stresu	Odolnost vůči vysokému obsahu etanolu (14 obj. %) Odolnost vůči vysokým koncentracím SO ₂ Tolerance k pH 3,0 Odolnost vůči nízkým teplotám Odolnost vůči bakteriofágům
Technologické vlastnosti	Vysoká aktivita MLF Schopnost vykonávat MLF v různých druzích vín Uspokojivý růst v syntetickém médiu Výroba žádoucích příchutí nebo zlepšení ovocného aroma Nízká produkce kyseliny octové Nesmí být žádná produkce látek s polysacharidy Žádná produkce látek způsobující pachutě Kompatibilita s kvasinkami alkoholové fermentace (AF) Mohou být lyofilizovány
Bezpečnost	Žádná produkce biogenních aminů Žádná produkce ethylkarbamátu Neschopnost přenášet genovou rezistenci

Bakteriální populace *Oenococcus oeni* potřebná k zahájení MLF musí být minimálně 10⁶ CFU.ml⁻¹. Pro bezproblémové zahájení MLF se z důvodu stresu, který bakterie podstupují v prostředí vína nebo moštu, doporučuje velikost inokulace

bakteriální populace 10^8 až 10^{10} CFU.ml⁻¹. Inokulace větší populace bakterií všeobecně zrychluje nástup a délku trvání MLF. Při dodržení inokulačních předpisů výrobců přípravků bakteriálních kultur by měla bakteriální populace dosahovat až 10^{11} CFU.ml⁻¹. I v tomto případě platí dodržení komplexních výživových podmínek bakterií (www.lalittorale.fr, 2015; www.chr-hansen.com, 2016; HENICK-KLING, 1995).

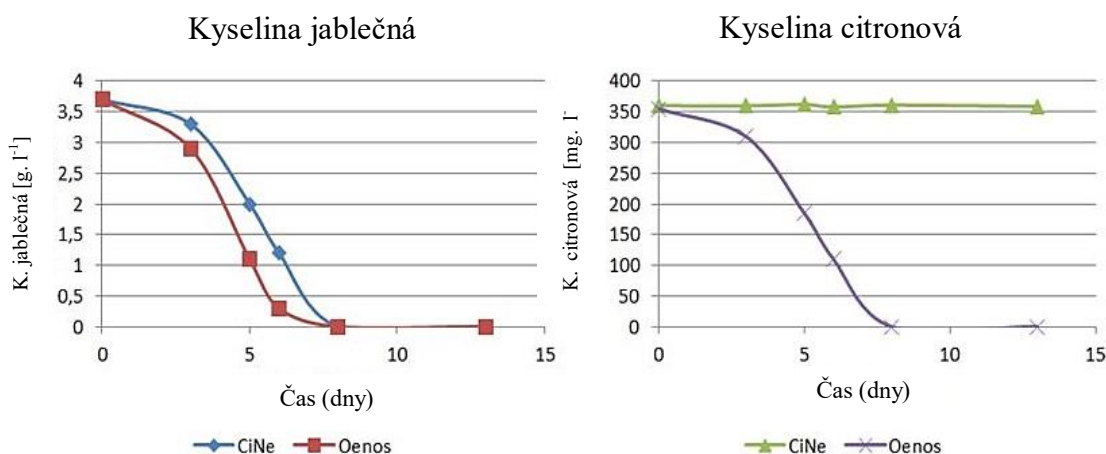


Graf 2 Příklad spontánní MLF a inokulace kmene *Oenococcus oeni* (www.chr-hansen.com, 2016)

Bakteriální kultura se před inokulací většinou připravuje rozmrazením při pokojové teplotě a nasypáním granulátu přímo do vína. Další variantou je příprava ve skleněné nádobě (demžonu) rozmícháním mixu 3 l vody, 3 l hroznové šťávy a 30 g výživy a upravením na pH 4,0, poté se přidá bakteriální kultura a vše se důkladně promíchá. Teplota média se udržuje 18-24 °C a po přibližně 48 hodinách vyrovnání teplot může proběhnout inokulace do vína nebo moštu (KÖNIG, a další, 2009).

Druhy preparátů bakterií MLF jsou vyráběny z nejlepších selektovaných kmenů *Oenococcus oeni* a *Lactobacillus plantarum*, nebo kombinací těchto dvou bakteriálních kmenů pokrývajících všechny typy vinařských aplikací a nároků na MLF. Vinaři mohou vybírat z kmenů pro zpracování bílých, růžových a červených vín se vztahem ke konečnému chuťovému profilu vína, jako je například zlepšení intenzity ovocné chuti, tak aby sofistikované aromatické profily odrážely rozmanitost vín. Nové kmeny mohou redukovat množství diacetylu (máselné a smetanové příchutě), vznikající při MLF nulovou spotřebou kyseliny citronové. Z preparátů dostupných na trhu můžeme například uvést „Viniflora® Nova™ od firmy Chr. Hansen Holding A/S“, obsahující kmen *Lactobacillus plantarum* se zcela novým způsobem použití. MLF probíhá před a během alkoholové fermentace a inokuluje se 24 hodin před kvasinkami. Tento přístup se nazývá reverzní MLF. Preparát „Co-inoculant Anchor od firmy LA LITTORALE“ je směs *Oenococcus oeni* a *Lactobacillus plantarum*, určená především do bílých

a růžových vín. Preparát „MaloStar Fruit od firmy LA LITTORALE“ obsahuje kmen citrát-negativních bakterií *Oenococcus oeni*, nezahrnující do svého metabolismu kyselinu citronovou. Neprodukuje dyacetil a máselné tóny, stejně jako preparát „Viniflora® CiNe od firmy Chr. Hansen Holding A/S“ (www.chr-hansen.com, 2016; www.lalittorale.fr, 2015).



Graf 3 Spotřeba kyseliny jablečné a kyseliny citronové za použití bakterií *Oenococcus oeni*, zahrnující citrát-negativní kmen (CiNe) a běžný kmen (Oenos) v bílém víně (www.chr-hansen.com, 2016)

Většina startovacích kultur, které jsou k dispozici na trhu, se skladují podchlazené, nebo mražené v originálním neporušeném obalu. Obal by měl být otevřen až těsně před použitím. Kromě toho, lyofilizované bakterie by se měly vyhnout kontaktu s kyslíkem, nadměrnou vlhkostí a vysokými teplotami. Tyto podmínky jsou škodlivé pro přežití skladovaných bakterií (www.chr-hansen.com, 2016).

Při **načasování inokulace startovací kultury bakterií** používané ve vinařství k MLF se vinař potýká s rozhodnutím pro určení správné doby. Bakteriální kultury mohou být inokulovány současně s kvasinkami nebo v rané fázi alkoholové fermentace, ke konci s využitím zbytkového tepla a po dokončení alkoholové fermentace. Načasování má velký vliv na sensorický projev vína. Inokulace před a na začátku alkoholové fermentace má potenciální problém, spojený s antagonistickou interakcí mezi kvasinkami a bakteriemi, nebo produkcí kyseliny octové v důsledku přítomnosti zkvasitelných uhlohydrátů. Antagonistická interakce může vést k inhibici bakterií, což má za následek zpoždění nebo selhání MLF. Studie ukazují, že obsah těkavých kyselin je sice vyšší při inokulaci před alkoholovou fermentací než po, ale většinou nepřekračuje sensoricky

prahovou hodnotu. Je tedy důležitý výběr správné kombinace vlastností bakteriálního a kvasinkového preparátu k inokulaci. Nevhodná kombinace způsobuje poruchy v průběhu MLF. Tento typ inokulace s pozitivními účinky se většinou aplikuje u bílých vín kmenem *Lactobacillus plantarum* ale i vybranými kmeny *Oenococcus oeni*. Je důležité řídit teplotu celého procesu, která by neměla překračovat hodnoty nad 25 °C (FUGELSANG, a další, 2007; PAVLOUŠEK, 2010). Inokulací ke konci alkoholové fermentace lze využít zbytkové teplo. Provádí se většinou u červených vín po vylisování. Výhodou je úspora energie k ohřevu na požadovanou teplotu, možnost dobré adaptace bakteriální kultury ve víně a tím rychlý a bezproblémový průběh MLF. Musí se však dávat pozor na dostupnost živin pro bakterie a potenciálně vysoký obsah zbytkových cukrů, tak aby nedocházelo ke zvýšené tvorbě těkavých kyselin. Doporučuje se vždy před MLF provést laboratorní rozbor vína. Inokulace bakteriální kultury po alkoholové fermentaci se provádí jen selektovanými kmeny druhu *Oenococcus oeni*, které jsou odolnější k působení stresových faktorů. Zahájení MLF může zpomalit obsah SO₂ v kombinaci s alkoholem a nízká hodnota pH 3,0. Inokulací do úplně prokvašeného vína bez zbytkového cukru >2 g.l⁻¹ se snižuje riziko metabolismu cukrů (hexóz) bakteriemi a nedochází k nadměrné tvorbě těkavých kyselin. Pro hladký průběh MLF je nutné dodržet výživové požadavky *Oenococcus oeni* (PAVLOUŠEK, 2010; RIBÉREAU-GAYON, a další, 2006).

3.5.7 Vliv MLF na objem vazebných partnerů SO₂

Nedílnou součástí výroby vína je oxid siřičitý (SO₂). Snaha o minimalizaci obsahu SO₂ ve víně vede ke snížení nepříznivých vlivů vnímaných spotřebiteli. Komerční kmeny *Oenococcus oeni* vykazují schopnost degradovat nejvýznamnější vazebné partnery SO₂, například kyselinu galakturonovou, kyselinu α-ketoglutarovou, kyselinu pyrohroznovou a acetaldehyd. Rozsah degradace je závislý vždy na konkrétním kmeni *Oenococcus oeni*. Většina kmenů *Oenococcus oeni* degraduje průměrně polovinu původního obsahu kyseliny α-ketoglutarové. Hladina kyseliny pyrohroznové se v průběhu MLF rychle snižuje a téměř úplně mizí. Acetaldehyd je bakteriemi *Oenococcus oeni* metabolizován na etanol a kyselinu octovou nepatrně v průběhu MLF, avšak rychlá fáze metabolismu acetaldehydu nastává až po úplném vyčerpání kyseliny jablečné a trvá asi 5 až 9 dnů. V průběhu MLF bakterie *Oenococcus oeni* metabolizují vazebné partnery SO₂ a snižují potřebu obsahu vázané SO₂ téměř o 22 %. Sedm dnů po vyčerpání kyseliny jablečné je

celková potřeba vázaného SO₂ až o 75 % nižší, za další dva až tři týdny dochází ke snížení potřeby vázaného SO₂ už jenom o 6 až 8 %. Velkou roli zde hraje metabolismus acetaldehydu, který je nejobsáhlejším vazebným partnerem ve víně. Post-MLF aktivita bakteriálních kmenů *Oenococcus oeni* může způsobovat degradaci cukrů a dekarboxylaci aminokyselin, což může vést ke snížení kvality vína produkcí kyseliny octové, biogenních aminů a citrulinu jako prekurzoru karcinogenního etylkarbamátu. Týden po vyčerpání kyseliny jablečné se ukazuje jako účinný časový úsek pro snížení vazebných partnerů SO₂ s minimálním rizikem metabolických transformací škodlivých pro celkovou kvalitu vína (JACKOWETZ, a další, 2012).

Acetaldehyd: je karbonylová sloučenina a hlavní vazebný partner SO₂ ve víně. Chuťově a aromaticky se projevuje jako rozdrčené jablko, ořechy a sherry, ale může být také příznakem oxidace vína. Acetaldehyd v červených vínech přispívá ke složitosti aroma, dokud koncentrace nepřekročí 100 mg.l⁻¹. *Oenococcus oeni* dokáže metabolizovat 90 % acetaldehydu během bakteriální růstové fáze a další během stacionární fáze při pH 3,3. Vliv etanolu a kyseliny octové z metabolismu acetaldehydu je na víno malý. Nízký obsah acetaldehydu může ovlivnit konečnou barvu vína. V přítomnosti SO₂ nejsou bakterie schopny odbourat acetaldehyd vázaný na tuto molekulu. Chemická vazba acetaldehydu s SO₂ částečně inhibuje růst *Oenococcus oeni* a obsah acetaldehydu se může zvýšit až na 380 mg.l⁻¹ (KÖNIG, a další, 2009; OSBORNE, a další, 2006).

3.5.8 Vliv MLF na aromatický profil vína

Oenococcus oeni je hlavní základní bakterie, provádějící MLF prakticky ve všech červených vínech a v rostoucím počtu bílých a šumivých vín. V průběhu posledního desetiletí je stále více dokazováno, že *Oenococcus oeni* vykazuje rozmanité spektrum sekundárních metabolických aktivit během MLF, které ovlivňují sensorické vlastnosti vína. Tyto sekundární aktivity zahrnují metabolismus organických kyselin, sacharidů, polysacharidů a aminokyselin a četné enzymy glykosidázy, esterázy a proteázy, které generují těkavé sloučeniny nad detekční sensorický práh. Fenotypové rozdíly mezi kmeny *Oenococcus oeni* jsou zásadní pro výrobu různých typů vína. Nedávné studie, založené na poli srovnávání hybridizace a sekvencování genomu *Oenococcus oeni*, odhalily velkou genomovou rozmanitost v rámci tohoto druhu. Například některé kmeny vykazují zvýšenou produkci aroma červených bobulí a ovoce u červených vín (BARTOWSKY, a další, 2011). Poměrně tvrdé podmínky (pH 3,3 a 14,8 obj.% etanolu)

a zdlouhavý čas MLF prohlubovaly rozdíly mezi jednotlivými kmeny *Oenococcus oeni* v produkci aromatických sloučenin. Rozsah a rozmanitost dopadů MLF na chemické a senzorické vlastnosti vína byly přímo ovlivněny volbou bakteriálního kmene. Bylo prokázáno, že β -glykosidázy se částečně podílejí na modulaci ovocné vůně a že esteráza hraje klíčovou roli s jinými enzymatickými aktivitami a ovlivňuje sloučeniny obsahující síru, jako jsou například thiooly (COSTELLO, a další, 2012). Hlavní těkavé sloučeniny, které se objevují ve víně po MLF, jsou diacetyl, acetoin, etyl laktát a malé množství kyseliny octové. Diacetyl produkovaný degradací přítomné kyseliny citronové je považován za nejdůležitější aroma projevující se jako máslo nebo smetana (mléčná příchut') (DAVIS, 1985). Bakterie *Oenococcus oeni* produkují malé množství exopolysacharidů, které se vážou s taniny zodpovědnými za trpkost mladých vín, a tak přispívají ke snížení svíravé huti a víno se stává jemnějším (CIEZACK, 2010). Mono a diglukosidy jsou prekurzory netěkavých aromatických sloučenin, jako jsou norisoprenoidy a vysoce vonné terpeny. Aromatické sloučeniny linalol, farnesol a β -damascenon se uvolňují v průběhu MLF s různou intenzitou, v závislosti na bakteriálním kmenu a složení substrátu. Uvolňování odrůdě specifických těkavých sloučenin bylo závislé na množství přístupných živin, nebo dodaném druhu výživy (UGLIANO, a další, 2003).

3.6 Vady vín způsobené mléčnými bakteriemi a MLF

3.6.1 Těkavé kyseliny a octovatění

Těkavé kyseliny a octovatění způsobují kvasinky, octové bakterie za aerobních podmínek a vysokých teplot (30 až 35 °C) a mléčné bakterie na počátku MLF ve víně za přítomnosti zbytkového cukru nad 4 g.l⁻¹ a vysokého pH 3,5. Mezi těkavé kyseliny patří kyselina octová s prahovým vnímáním 280 mg.l⁻¹, kyselina mravenčí, vyšší mastné kyseliny (kyselina propionová, kyselina máselná, ...), kyselina D-mléčná a další. Ve víně se kyseliny vyskytují ve volné formě, nebo jako estery s alkoholem. Octovatění a tvorbě těkavých kyselin se dá předcházet zpracováváním zdravého hroznového materiálu, řízenou AF a následující MLF, udržováním plných nádob, sanitací zařízení na zpracování hroznů a skladování vína, dále taktéž dostatečným sířením. Octovatění se v pokročilém stádiu nedá odstranit. Při lehčí formě je možnost scelení s jiným vínem (EDER, a další, 2006; PAVLOUŠEK, 2010).

3.6.2 Diacetyl

Je to důležitá molekula spojená s MLF, prchavý di-keton, karbonylová sloučenina, která se projevuje máselným nebo karamelovým aroma, ale při nízkých koncentracích to může být ořech nebo toust. Diacetyl se stává problematickým až při překročení koncentrace 4 mg.l^{-1} . Smyslové vnímání diacetylu ve víně je $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ a u červených až $2,8 \text{ mg.l}^{-1}$, to vše je závislé na přítomnosti dalších sloučenin, stáří, stylu a původu vína. Faktory, kterými vinař může ovlivnit koncentraci diacetylu ve víně, jsou oxidace, fermentační teplota, hladina SO_2 a délka MLF. Bylo rovněž zjištěno, že k výraznému snížení koncentrace diacetylu dochází u červených vín různých ročníků, ležených po dobu tří let při $15 \text{ }^\circ\text{C}$. U bílých vín k tomuto efektu nedochází. Diacetyl vzniká z metabolismu kyseliny citronové kapitola 3.4.2 (BARTOWSKY, a další, 2002; EDER, a další, 2006).

3.6.3 Vláčkovatění (olejnatění)

Tato vada je většinou rozpoznána jako zvýšení hustoty vína a je relativně snadno odstranitelná. Způsobují ji bakterie rodu *Pediococcus* (především druhy *Pediococcus damnosus* a *Pediococcus pentosaceus*), *Lactobacillus* a *Leuconostoc* vytvářením extracelulárních polysacharidů z glukózy, fruktózy, sacharózy, maltózy, manózy, kyseliny ribonukleové a proteinu za zvýšení viskozity. Překvapivě nízké hladiny glukózy (50 až 100 mg.l^{-1}) jsou dostatečné pro tvorbu polysacharidu. Ohrožena jsou zejména vína mírně oxidující s nízkým obsahem kyselin a etanolu, nebo vína plněná příliš brzy, u kterých se rozvinuly v láhvi mléčné bakterie. Další riziko je u mladých vín s nízkým obsahem SO_2 . Vína postižená touto chorobou jsou zakalená, slizovitá s mírným výskytem bublinek CO_2 , při nalévání se táhnou a chuť je fádni a zvětralá. Nemoc je spojena se zvýšeným obsahem těkavých kyselin a diacetylu. Při zjištění nemoci je doporučeno vína přečerpat přes sprchovací hlavici, silně zasířit a za pár dní přefiltrovat (FUGELSANG, a další, 2007; EDER, a další, 2006).

3.6.4 Manit a akrolein

Některé mléčné bakterie mohou metabolizovat glycerol za vzniku 3-hydroxypropionaldehydu (3-HPA) sloučeniny, která se dále přeměňuje buď na 1,3-propandiol (1,3-PDL), nebo oxiduje na kyselinu 3-hydroxypropionovou (3-HP), nebo

podstoupí chemickou dehydrataci za vzniku akroleinu. Akrolein reaguje s antokyany a fenoly za vzniku výrazně hořkých sloučenin. Mléčné heterofermentativní bakterie mohou z fruktózy vytvářet manit. Manitové kažení vína je velmi složité, neboť je doprovázeno kyselinou octovou, kyselinou D-mléčnou, n-propanolem, 2-butanolem a často nadměrnou produkcí diacetylu. Ohroženými jsou vína s nízkým obsahem etanolu, SO₂ a kyselin. Vína po manitu chutnají odporně (GARAI-IBABE, a další, 2008; EDER, a další, 2006).

3.6.5 Myšina

Patří mezi nepříjemné choroby vína, výrazně postihující jeho aromatický a chuťový projev. Způsobují ji zejména některé heterofermentativní kmeny laktobacilů (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus hilgardii* a *Lactobacillus cellobiosus*), jakož i rod *Oenococcus* a kvasinka *Brettanomyces*. Tento typ nemoci je charakteristický tvorbou nepříjemného zápachu připomínajícího hlodavce, myší moč s tóny zatuchlosti se stejným projevem pachutě v ústech. Chorobu v počátečním stádiu lze zaměnit s projevem mírné sirky nebo pachutí po kvasnicích. Spolehlivě lze chorobu určit rozetřením vína mezi prsty a po odpaření je cítit charakteristický zápach myšiny. Costello a Henschke (2002) uvádí, že 2-etyl-tetrahydropyridin, 2-acetyl-1-pyrollin a 2-acetyltetrahydropyridin přispívají k projevu této vady. Syntéza těchto látek vyžaduje přítomnost etanolu, proto je tato vada záležitostí spíše vína než moštu. Prahová sensorická hodnota těchto látek je velmi nízká, 1,6 µg.l⁻¹. Potenciálně ohrožená vína, kde se může myšina vyskytnout, jsou vína se zbytkovým cukrem ležící na kalech při vyšších teplotách, nízkým obsahem kyselin, mírně oxidovaná, s nedostatkem SO₂ a vysokým pH. Myšina je z vína těžce odstranitelná a při silném projevu prakticky neodstranitelná. Lehké projevy v chuti lze odstranit silným sířením a následnou sterilní filtrací. Další možností je následné scelení s vínem bohatým na kyseliny. Pak už je jenom možnost překvašení, nebo použití aktivního uhlí. Jestli nápravná opatření nemají úspěch, je víno nenávratně zkažené (COSTELLO, a další, 2002; EDER, a další, 2006).

3.6.6 Biogenní aminy

Vznikají z dekarboxylace aminokyselin některými BMK. Jako takové se tyto sloučeniny nachází v různých fermentovaných potravinách. Ve víně to jsou histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, fenyletylamin, a jiné. Ze zdravotního hlediska konzumace

nadměrného množství vína s obsahem biogenních aminů může vést k bolesti hlavy a dalším příznakům. Bakterie rodu *Pediococcus* a *Lactobacillus* mohou tyto látky vytvářet, ale i výběr kmene kvasinek pro alkoholovou fermentaci může ovlivnit produkci biogenních aminů. Ne všechny kmeny v rámci druhu *Oenococcus oeni* mohou tvořit biogenní aminy. Omezit syntézu biogenních aminů můžeme použitím startovacích kultur, které nedekarboxylují aminokyseliny. Celkové obsahové hodnoty biogenních aminů mají velké rozpětí. Významnou roli zde hraje zdravotní stav hroznů. Zdravé hrozny obsahují celkově do 7,3 mg.l⁻¹ biogenních aminů, hrozny napadené hnilobou až 28,8 mg.l⁻¹. Biogenní aminy lze z části odstranit čířícími prostředky, jejich účinnost je však různá. Dobrý účinek na omezení histaminu má bentonit, ale účinnost je závislá na dávce a koncentraci histaminu. Dávka 400 g.l⁻¹ bentonitu při vysokém obsahu histaminu jej může snížit až o 70 %. Bentonit je vhodný k redukci izopentylaminu a kadaverinu. Dalším prostředkem je aktivní uhlí, jeho použitím ale výrazně ovlivníme aroma. Kasein, vyzina, PVPP jsou neúčinné (ROSI, a další, 2009; EDER, a další, 2006; GUERRINI, a další, 2002).

4 Praktická část

Je založena na pokusu s červeným vínem odrůdy Zweigeltrebe, vlivu různých dob načasování inokulace bakteriálního kmene *Oenococcus oeni* metabolizujícího kyselinu citronovou a kmene *Oenococcus oeni*, který kyselinu citronovou do svého metabolismu nezahrnuje. Dále se zabývá sledováním průběhu MLF, hodnot obsahu kyseliny jablečné, kyseliny octové a kyseliny citronové v průběhu různých typů MLF a dílčím měřením spotřeby kyselin bakteriemi. Výsledkem je vyhodnocení vlivu provedené MLF s různou dobou inokulace dvou typů kmene *Oenococcus oeni* na organoleptické vlastnosti a kvalitu vína.

4.1 Materiál a metody

4.1.1 Základní materiál

Jako základní materiál byla použita červená moštová odrůda Zweigeltrebe z katastru obce Lipov z produkční vinice firmy AGROLIP, a.s. Vinice je zařazena do vinařské oblasti Morava, podoblasti Slovácko a viniční trati Dlouhé Pole v nadmořské výšce 227 m. Geologicky je tato oblast nivnické souvrství flyšových vrstev s převahou vápnatých jílovců. Region je středně svahovitý, klimaticky teplý, mírně vlhký, s ročním průměrným úhrnem srážek 550 až 650 mm. Půda je jílovito-kamenitá, středně těžká, drobtovitého charakteru, slabě skeletovitá s dobrým obsahem humusu (www.geologicke-mapy.cz, 2016; bpej.vumop.cz, 2015).

Zweigeltrebe je modrá moštová, středně raná až raná odrůda se středně bujným růstem. Původem je z Rakouska, kde ji v Klosterneuburgu vyšlechtil F. Zweigelt křížením odrůd Svatovavřínecké a Frankovka. V české republice byla zapsána do odrůdové knihy v roce 1980. Zweigeltrebe je nenáročná odrůda na stanoviště a půdu. Zweigeltrebe má střední odolnost proti houbovým chorobám, mrazům a suchu. Má vzpřímený růst, středně velké hrozny, bobule mají pevnou slupku. Víno je odrůdově typické, tmavě granátové barvy s fialovým zábleskem. Z počátku má víno hrubší chuťový projev, ale v průběhu zrání se stává harmonickým s jemnou tříslovinou. V chuti lze nalézt ostružiny, višně, višňový kompot. Aroma má ovocně kořenitý charakter (www.wineofczechrepublic.cz, 2015).

4.1.2 Kvasinky BS8

Kvasinky BS8 inokulované do moštu k provedení alkoholové fermentace jsou odrůdové aktivní suché vinné kvasinky (ASVK) druhu *Saccharomyces cerevisia* od firmy BS vinařské potřeby. Kvasinka BS8 podporuje plná ovocná vína a je určená pro odrůdy Zweigeltrebe, Frankovka a André. Inokulační dávka do moštu k vyprodukování optimální života schopné populace kvasinek je 20 g na 100 l (www.vinarskepotreby.cz, 2012).

4.1.3 Bakteriální kultury

Inokulované bakteriální kultury zahrnovaly rozdílné selektované bakteriální kmeny druhu *Oenococcus oeni*. Pro účel zkoumání vlivů bakteriální kultury byly vybrány dva kmeny od výrobce Chr. Hansen A/S.

VINIFLORA®-OENOS: vysoce aktivní kmen (DSM 7008) bakterie *Oenococcus oeni*. Technologie zpracování umožňuje přímé, rychlé a spolehlivé naočkování do vína bez reaktivace. VINIFLORA®-OENOS je vysoce čistý koncentrát buněk *Oenococcus oeni* sušených vymrazováním k přímému nasypání do vína. Bakterie má schopnost zahájit látkovou výměnu a odbourávání kyseliny jablečné do dvou až tří dnů po naočkování. VINIFLORA®-OENOS splňuje požadovaná enologická kritéria, kterými jsou organoleptická čistota vína (nevytváří vedlejší produkty metabolismu), vysoká tolerance k etanolu do 14 obj. %, odolnost vůči SO₂ (10 mg.l⁻¹ volné nebo 30 mg.l⁻¹ veškeré) a snášenlivost nízkých hodnot pH 3,1. MLF jsou bakterie schopny provést za 1–4 týdny dle náročnosti prostředí daného média. Balení se dodává v plynotěsných, vodě odolných sáčcích z vícevrstvé hliníkové fólie. Po otevření se musí obsah sáčku bezprostředně vysypat do moštu nebo vína. Vzdušný kyslík a vlhkost bakterie v krátkém čase inaktivuje. Nádoby musí být v průběhu MLF plné a uzavřené. Teplota média při naočkování a v průběhu MLF by měla činit 17 až 25 °C. Bakterie odbourávají kyselinu citronovou (www.chr-hansen.com, 2016).

VINIFLORA®-CiNe™: je nově selektovaný koncentrovaný hluboce zmrazený bakteriální kmen *Oenococcus oeni*. Tento nový kmen nezahrnuje do svého metabolismu přirozeně se v moštu a víně vyskytující kyselinu citronovou a tím z ní neprodukuje diacetyl, kyselinu octovou nebo 2,3butandiol. VINIFLORA®-CiNe™ taktéž nevytváří žádné aminy z aminokyselin. Víno by mělo být po použití tohoto kmene harmonické,

jemnější a bez senzoričkého projevu diacetylového aroma. VINIFLORA®-CiNe™ se inokuluje přímo nasypáním do vína. Pozor, po otevření vzdušný kyslík a vlhkost bakterie v krátkém čase inaktivuje. Nádoby se v průběhu MLF udržují plné a uzavřené. Doporučené hodnoty vína (moštu) před a při inokulaci jsou: zbytkový cukr > 10 g.l⁻¹, teplota 17 až 22 °C, obsah SO₂ maximálně 20 mg.l⁻¹ volné nebo 40 mg.l⁻¹ veškeré, pH 3,2 a obsah etanolu do 14,5 obj. %. Bakterie začínají svoji aktivitu po 2 až 3 dnech a jsou schopny provést MLF za 1 až 2 týdny. Bakterie v originálním a neporušeném obalu lze skladovat při teplotě -18 °C nejdéle po dobu 36 měsíců (www.chr-hansen.com, 2016).

4.1.4 ALPHA

Alpha ATR modul je navržen tak, aby se daly snadno provádět rutinní analýzy. Analyzátor se snadno čistí a není nutná zvláštní příprava vzorků. Snadno použitelný software v kombinaci s moduly pro odběr vzorků QuickSnap™ zajišťují výkonné a spolehlivé FT-IR analýzy bez spotřebního materiálu. Alpha ATR modul ve víně analyzuje celkové kyseliny, alkohol, kyselinu octovou, pH,



Obrázek 8 Analyzátor Alpha wine ATR (www.brukeroptics.cz, 2016)

hustotu, kyselinu jablečnou, mléčnou a vinnou, celkové cukry, glukózu, fruktózu, sacharózu a glycerol. Ve vinném moštu dokáže stanovit °NM, celkové kyseliny, asimilovatelný dusík, zkvasitelné cukry, glukózu, fruktózu, kyselinu vinnou, jablečnou, mléčnou, citronovou (www.brukeroptics.cz, 2016; www.biopro.cz, 2016).

4.1.5 Kapalinová chromatografie

Charakteristika: Chromatografická separační metoda je založena na rovnovážné distribuci látek daného vzorku mezi dvěma fázemi, kde jedna je mobilní a druhá stacionární. Mezi stacionární a mobilní fází musí být fázové rozhraní, tak aby unášené složky vzorku obtékaly stacionární fází. Mezi protékající mobilní a stacionární fází dochází při dělení separovaných látek k opakovanému vytvoření rovnovážných stavů. Poměr rovnovážných koncentrací mezi dvěma fázemi lze označit jako distribuční (rozdělovací) konstanta. Každá složka má různou hodnotu distribuční konstanty. Čím je hodnota konstanty pro danou látku vyšší, tím déle molekuly zůstanou ve stacionární fází

(látka má větší retenci). Pro dělení jednotlivých složek se distribuční konstanty musí lišit. Distribuční konstanty se určují na základě zákonitosti fyzikální povahy rozdělovacího děje. Kapacitní poměr udává poměr látkového množství solutu ve stacionární fázi k jejímu látkovému množství ve fázi mobilní. Retenční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky, a retenční objem je proteklý objem kolonou za tuto dobu. Dávkovací vysokotlaký ventil umožňuje dávkovat analyzovanou látku i při tlaku 60 až 80 MPa (<http://www.hplc.cz/>, 2013).

Chromatografická kolona je trubka nebo kapilára rovnoměrně pokrytá nebo naplněná stacionární fází. Plášť kolony udržuje pohromadě stacionární fázi a musí být chemicky inertní, odolávat vysokým tlakům a vnitřní povrch pláště musí mít dostatečně hladký povrch. Kolona může být vyrobena s nerezové oceli (AISI 316), plastu (PEEK) nebo skla. Životnost kolony je závislá na použitých analyzovaných vzorcích (<http://www.hplc.cz/>, 2013).

4.1.6 Titrační metody a stanovení pH

Stanovením veškerých titrovatelných kyselin (EEC No 2676/90) se rozumí suma sloučenin titrovatelných odměrným alkalickým roztokem ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH) do pH 7,0 s vyloučením kyseliny uhličitě. Do kádinky se naleje 50 ml roztoku (vína, moštu) a třepáním se odstraní oxid uhličitý. Pipetou se z tohoto roztoku odměří 10 ml vína do titrační kádinky a doplní 10 ml destilované vody. Do připraveného roztoku se ponoří elektroda pH metru a za stálého míchání se přidává roztok $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH, až se dosáhne hodnoty pH 7,0 při 20 °C. Vyhodnocení a výpočet se provádí pomocí vzorce:

$$x = a \cdot f \cdot 0,75$$

x = g.l^{-1} veškerých titrovatelných kyselin

a = ml spotřebovaného ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH) roztoku

f = faktor $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH

Stanovení oxidu siřičitého titrací odměrným roztokem jódu se provádí tak, že při titraci volného SO_2 se do kónické baňky o objemu 250 ml pipetou, která se dotýká dna baňky, vpustí 50 ml vína. Ihned se přidá 10 ml 16% roztoku H_2SO_4 a 5 ml 0,5 % škrobového mázu. Následně se provede titrace $0,02 \text{ mol.l}^{-1}$ roztokem jódu. Jakmile se médium zbarví do modra, zaznamená se spotřeba roztoku jódu (hodnota a_1). Zbarvení vydrží zhruba 30 sekund. Titrace veškerého SO_2 je následující: do kónické baňky se

odměří 25 ml 1 mol.l⁻¹ NaOH a 50 ml vína, po 15 minutách se přidá 15 ml 16% H₂SO₄ a 5 ml škrobového mázu. Následně se provede titrace 0,02 mol.l⁻¹ roztokem jódu. Jakmile se médium zbarví do modra, zaznamená se spotřeba roztoku jódu (hodnota a₂). Zbarvení vydrží zhruba 30 sekund. Vyhodnocení a výpočet se provede pomocí vzorce:

$$x_{1,2} = a_{1,2} * f * 12,8$$

$$x_3 = x_2 - x_1$$

x₁ = mg. l⁻¹ volného SO₂ vyjádřeno v celých číslech

x₂ = mg. l⁻¹ veškerého SO₂ vyjádřeno v celých číslech

x₃ = mg. l⁻¹ vázaného SO₂ vyjádřeno v celých číslech

a_{1,2} = spotřeba 0,02 mol.l⁻¹ roztoku jódu

f = faktor 0,02 mol.l⁻¹ roztoku jódu

Stanovení pH hodnoty je záporný dekadický logaritmus aktivity vodíkových kationů v moštu nebo víně. Hodnota pH se stanoví měřením potenciálu skleněné elektrody vzhledem k referenční kalomelové elektrodě kalibrovaným milivoltmetrem (pH-metrem) (BALÍK, 2004).

4.1.7 Senzorická analýza

K senzorickému vyhodnocení vína byl použitý stobodový systém. Hodnotí se vzhled (čirost, barva), vůně (intenzita, čistota, harmonie) a chuť (intenzita, čistota, harmonie, perzistence).

		VYNIKAJÍCÍ	VELMI DOBRÉ	DOBŘÉ	USPOKOJIVÉ	NEDOSTATEČNÉ
VZHLED	ČIROST	5	4	3	2	1
	BARVA	10	8	6	4	2
VŮNĚ	INTENZITA	8	7	6	4	2
	ČISTOTA	6	5	4	3	2
	HARMONIE	16	14	12	10	8
CHUŤ	INTENZITA	8	7	6	4	2
	ČISTOTA	6	5	4	3	2
	HARMONIE	22	19	16	13	10
	PERZISTENCE	8	7	6	5	4
CELKOVÝ DOJEM		11	10	9	8	7
ODRŮDA:	ZWEIGELTREBE					
ROČNÍK:	2015					
VZOREK:				BODY CELKEM:		

Obrázek 9 Stobodová degustační tabulka k hodnocení vín.

Dále byly určovány jednotlivé aromatické projevy červených vín v rozmezí intenzity 1 až 10, jako je květnatost, jádrové ovoce, tropické ovoce, peckové ovoce, drobné světlé ovoce, drobné tmavé ovoce, vařené a sušené ovoce, karamelizace, kořenitost, aroma bylinné (čerstvé), bylinné (sušené), barik a jiné.

4.2 Metoda zpracování

Hrozny moštové odrůdy Zweigeltrebe byly po sběru odzrněny. Rmut byl rozdělen po 50 kg do šesti pokusných vzorků, které byly umístěny v plastových otevřených šedesátilitrových kádích. Rmut byl každých 24 hodin promíchán. K účelům pokusu nebyly pokusné vzorky žádným způsobem upravovány přídavkem cukru, SO₂ nebo pomocných látek. Počáteční parametry moštu (rmutu) byly: cukernatost 20 °NM, celkový obsah titrovatelných kyselin 8,1 g.l⁻¹ a asimilovatelný dusík 210 mg.l⁻¹.

Po inokulaci komerčních kvasinek (BS8) začala AF do 24 hodin. Vzorky RH1 a RH4 byly inokulované bakteriemi do rmutu současně s kvasinkami před začátkem AF, vzorky RH2 a RH5 do rmutu na konci AF a vzorky RH3 a RH6 dva dny po AF do vína (Tabulka 4). Po ukončení AF byly vzorky samostatně vylisovány, aby nedošlo ke kontaminaci. Vylisované víno bylo odkaleno a umístěno do šesti skleněných demižonů o objemu 25 l. Ke každému pokusnému vzorku byly současně ještě vytvořeny 2,5 l vína ve skleněné nádobě k doplňování po odběru vzorků. Teplota fermentovaného média byla měřena rtuťovým teploměrem a při AF se pohybovala v průměru do 22 °C a po ukončení AF se teplota ustálila na 18 °C a přetrvávala až do ukončení MLF. Pokusné vzorky byly umístěny v klimatizované místnosti se stálou teplotou 15 °C. Víno 15 dní po ukončení MLF bylo stočeno, ošetřeno přídavkem 50 mg.l⁻¹ SO₂ a ponecháno ve skleněné nádobě při teplotě 15 °C.

Vzorky pro laboratorní analýzu byly odebírány po 24 hodinách o objemu 50 ml. Každý odebraný vzorek se zpracoval bezprostředně po odběru následovně:

- vytvoření dvou vzorků o objemu 1,5 ml, které byly zamrazeny při -20 °C pro další rozbor na analyzátoru ALPHA a kapalinovém chromatografu
- měření pH
- stanovení veškerých titrovatelných kyselin

Tabulka 4 Přehled doby inokulace a použitých bakteriálních kmenů MLF.

Odrůda	Vzorek č.	Kmen kvasinek	Doba inokulace	Bakteriální kmen
ZWEIGELTREBE	RH 1	BS8 (BS-vinařské potřeby)	Současně s kvasinkami na začátku alkoholové fermentace	VINIFLORA®-CiNe™ (citrátnegativní)
ZWEIGELTREBE	RH 2	BS8 (BS-vinařské potřeby)	Na konci alkoholové fermentace s využitím zbytkového tepla	VINIFLORA®-CiNe™ (citrátnegativní)
ZWEIGELTREBE	RH 3	BS8 (BS-vinařské potřeby)	Dva dny po alkoholové fermentaci	VINIFLORA®-CiNe™ (citrátnegativní)
ZWEIGELTREBE	RH 4	BS8 (BS-vinařské potřeby)	Současně s kvasinkami na začátku alkoholové fermentace	VINIFLORA®-OENOS (DSM 7008)
ZWEIGELTREBE	RH 5	BS8 (BS-vinařské potřeby)	Na konci alkoholové fermentace s využitím zbytkového tepla	VINIFLORA®-OENOS (DSM 7008)
ZWEIGELTREBE	RH 6	BS8 (BS-vinařské potřeby)	Dva dny po alkoholové fermentaci	VINIFLORA®-OENOS (DSM 7008)

4.2.1 Měření a analýzy

Stanovení veškerých titrovatelných kyselin bylo provedeno na přístroji metodou (EEC No 2676/90) viz (kapitola 5.1.6) a hodnota pH byla měřena elektrickým pH metrem.

Pro stanovení hustoty, alkoholu, fruktózy, glukózy, glycerolu, kyseliny mléčné, kyseliny jablečné, kyseliny vinné a sacharózy na analyzátoru ALPHA byl použitý vždy jeden ze dvou zamrazených 1,5ml vzorků. Vzorek před vložením do analyzátoru se v ohříváči rozmrazil, rozmíchal na tzv. třepačce a odstředil. Vzorek nebyl ředěn nebo upravován přidavkem chemikálií.

Vzorky pro rozbor na kapalinovém chromatografu byly předpřipraveny stejně jako pro analyzátor ALPHA. Další příprava vzorku před vložením do kapalinového chromatografu spočívala v rozředění destilovanou vodou v poměru 1 : 10 (vzorek : destilovaná voda).

4.3 Výsledky změny obsahu sledovaných kyselin v průběhu MLF

Tabulky 5 až 10 a grafy 4 až 9 znázorňují průběh degradace kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou, změnu obsahu kyseliny octové a kyseliny citronové v průběhu MLF u červené odrůdy Zweigeltrebe. Zahájení MLF bylo provedeno třemi různými způsoby za použití dvou bakteriálních kmenů druhu *Oenococcus oeni*, a to citrát-negativního a komerčního. Vzorky RH1 a RH4 byly inokulovány na začátku AF spolu s kvasinkami, vzorky RH2 a RH5 na konci AF a vzorky RH4 a RH6 dva dny po AF.

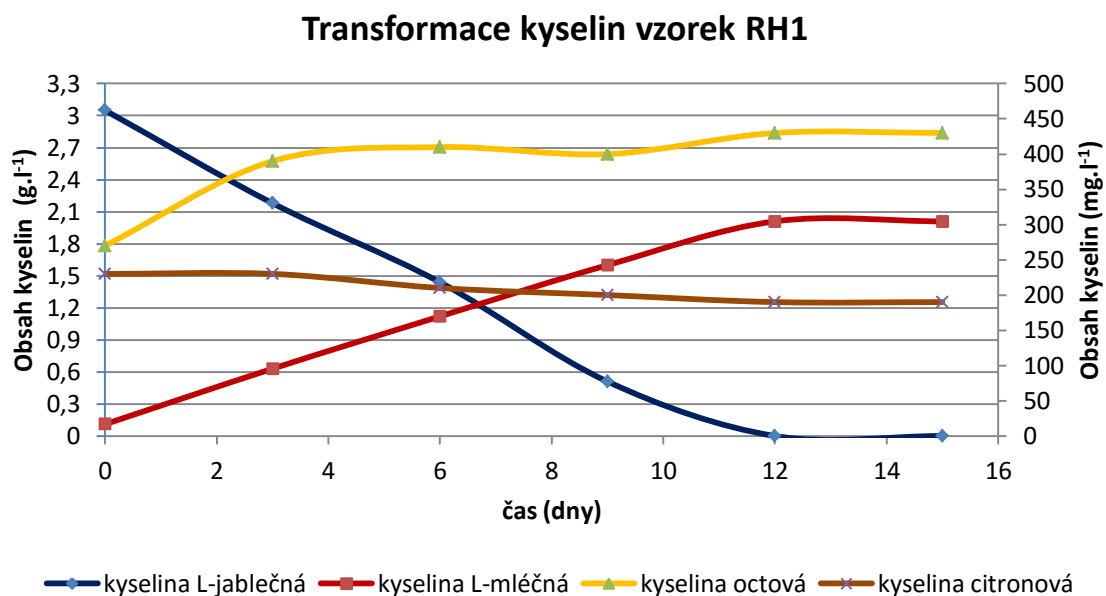
Použité komerční bakterie byly od výrobce Chr. Hansen A/S sušené vymrazováním, k přímému nasypání do vína. Vzorky RH1-3 byly inokulovány citrát-negativním bakteriálním kmenem VINIFLORA®-CiNeTM a vzorky RH4-6 bakteriálním kmenem (DSM 7008) VINIFLORA®-OENOS.

4.3.1 Vzorek RH1

Vzorek RH1 (Graf 4; Tabulka 5) byl inokulovaný citrát-negativními bakteriemi VINIFLORA®-CiNe™ spolu s kvasinkami před započítáním AF. Teplota v průběhu AF nepřesáhla 22 °C a po ukončení AF byla 18 °C. Snižování obsahu kyseliny L-jablečné bylo patrné už první den po inokulaci bakterií. Kyselina L-jablečná byla zcela přeměněna na kyselinu L-mléčnou. Obsah kyseliny octové se nepatrně zvýšil nad počáteční hodnotu a žádným způsobem neovlivnil výsledný produkt. Kyselina citronová zůstala zachována s minimálním úbytkem 40 mg.l⁻¹. MLF trvala celkem 12 dnů. Hodnota pH se v průběhu fermentace z hodnoty pH 3,35 zvýšila na pH 3,45. Po ukončení MLF víno leželo 15 dnů a poté bylo stočeno a ošetřeno přídatkem 50 mg.l⁻¹ SO₂.

Tabulka 5 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH1, (inokulace na začátku AF citrát-negativní kmen VINIFLORA®-CiNe™)

Dny		0	3	6	9	12	15
Kyselina L-jablečná	(g.l ⁻¹)	3,05	2,18	1,44	0,51	0,00	0,00
Kyselina L-mléčná	(g.l ⁻¹)	0,11	0,63	1,12	1,60	2,01	2,01
Kyselina octová	(mg.l ⁻¹)	270	390	410	400	430	430
Kyselina citronová	(mg.l ⁻¹)	230	230	210	200	190	190



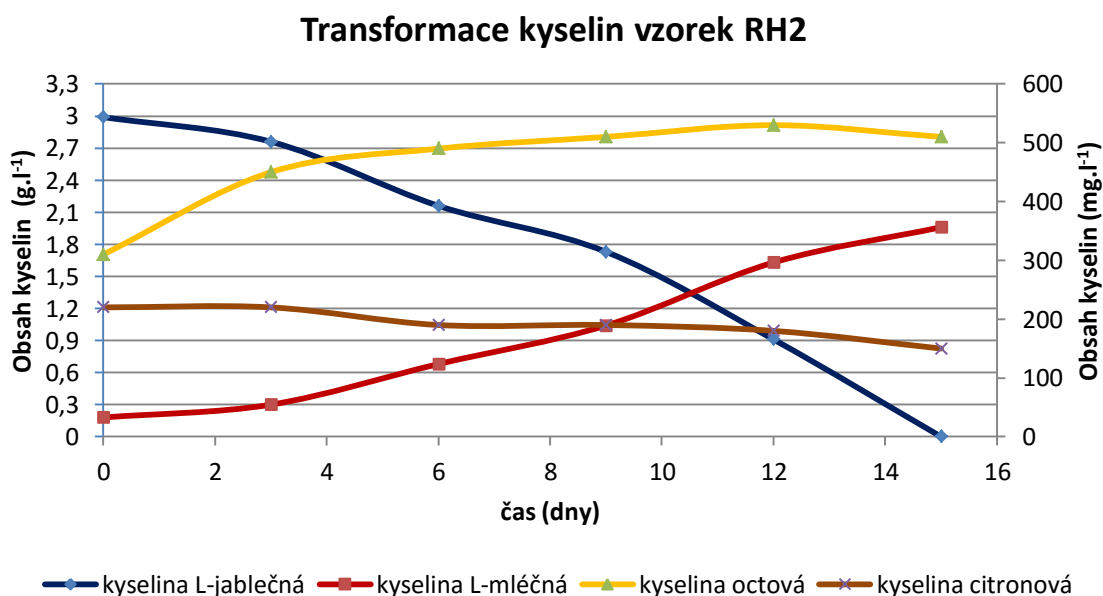
Graf 4 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH1, (inokulace na začátku AF citrát-negativní kmen VINIFLORA®-CiNe™)

4.3.2 Vzorek RH2

Inokulace citrát-negativními bakteriemi VINIFLORA®-CiNe™ u vzorku RH2 (Tabulka 6; Graf 5) byla provedena ke konci AF při pH 3,35 do rmutu. Teplota při inokulaci byla 20 °C a po dokončení AF probíhala MLF při 18 °C. Délka MLF v tomto případě byla do 15 dnů. Kyselina L-jablečná byla beze zbytku přeměněna na kyselinu L-mléčnou. Obsah kyseliny octové u vzorku RH2 se zvýšil z původních 310 mg.l⁻¹ na 510 mg.l⁻¹. Kyselina citronová zaznamenala nepatrný úbytek o 70 mg.l⁻¹. V průběhu MLF se zvýšilo pH z 3,35 na pH 3,48. Po ukončení MLF bylo víno po 15 dnech stočeno a ošetřeno přídatkem 50 mg.l⁻¹ SO₂.

Tabulka 6 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH2, (inokulace ke konci AF citrát-negativní kmen VINIFLORA®-CiNe™)

Dny		0	3	6	9	12	15
Kyselina L-jablečná	(g.l ⁻¹)	2,99	2,76	2,16	1,73	0,91	0,00
Kyselina L-mléčná	(g.l ⁻¹)	0,18	0,30	0,68	1,04	1,63	1,96
Kyselina octová	(mg.l ⁻¹)	310	450	490	510	530	510
Kyselina citronová	(mg.l ⁻¹)	220	220	190	190	180	150



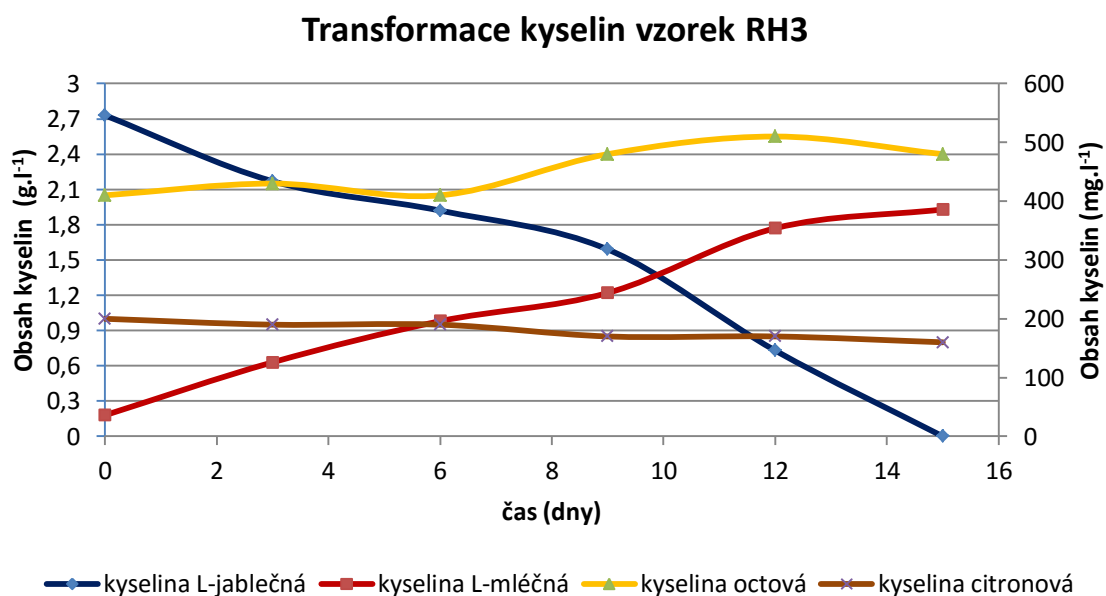
Graf 5 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH2, (inokulace ke konci AF citrát-negativní kmen VINIFLORA®-CiNe™)

4.3.3 Vzorek RH3

Bakterie pro zahájení MLF byly u vzorku RH3 (Tabulka 7; Graf 6) inokulované do odkaleného vína dva dny po ukončení AF při teplotě média 18 °C. Použitý bakteriální kmen byl citrát-negativní VINIFLORA®-CiNe™. Kyselina L-jablečná byla do 15 dnů zcela degradována na kyselinu L-mléčnou. Obsah kyseliny octové nezaznamenal razantní zvýšení. Kyselina citronová nebyla bakteriemi využita a její obsahový pokles byl nepatrný jen o 40 mg.l⁻¹. Víno bylo 15 dnů po ukončení MLF stočeno a ošetřeno přídatkem 50 mg.l⁻¹ SO₂.

Tabulka 7 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH3, (inokulace po AF citrát-negativní kmen VINIFLORA®-CiNe™)

Dny		0	3	6	9	12	15
Kyselina L-jablečná	(g.l ⁻¹)	2,73	2,17	1,92	1,59	0,73	0,00
Kyselina L-mléčná	(g.l ⁻¹)	0,18	0,63	0,98	1,22	1,77	1,93
Kyselina octová	(mg.l ⁻¹)	410	430	410	480	510	480
Kyselina citronová	(mg.l ⁻¹)	200	190	190	170	170	160



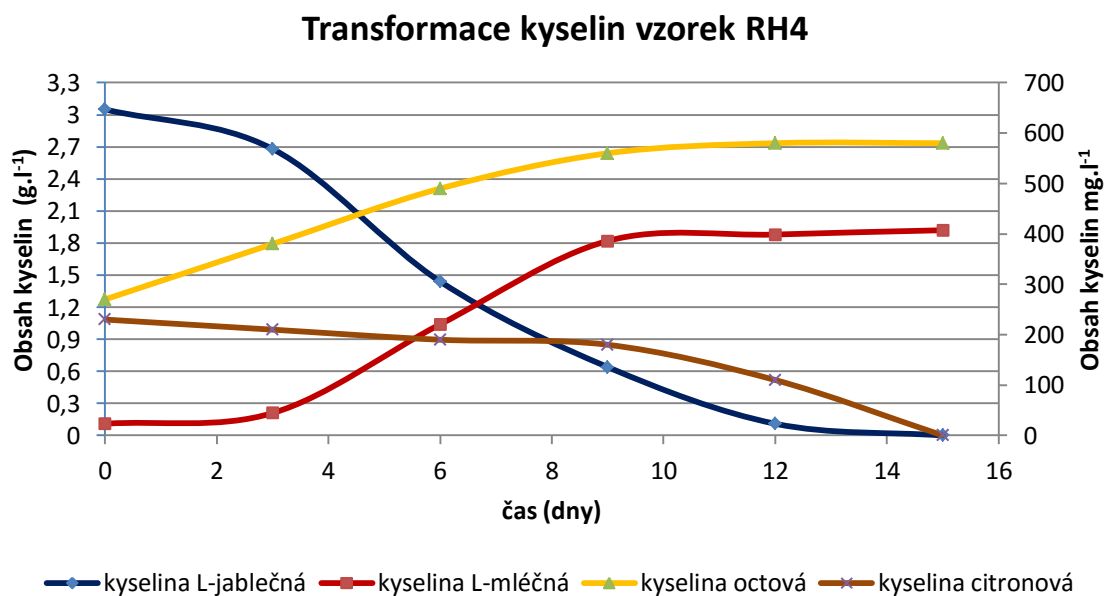
Graf 6 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH3, (inokulace po AF citrát-negativní kmen VINIFLORA®-CiNe™).

4.3.4 Vzorek RH4

U vzorku RH4 (Tabulka 8; Graf 7) byl inokulován bakteriální kmen (DSM 7008) VINIFLORA®-OENOS spolu s kvasinkami na začátku AF přímo do rmutu. Teplota v průběhu AF nepřesáhla 22 °C a po ukončení AF klesla na 18 °C. Veškerá kyselina L-jablečná byla bakteriemi přeměněna na kyselinu L-mléčnou. Kyselina octová u tohoto vzorku zaznamenala zvýšení na 580 mg.l⁻¹. Kyselinu citronovou bakterie zcela spotřebovaly. Degradace kyseliny L-jablečné začala do 24 hodin po inokulaci. Na začátku MLF byla hodnota pH 3,34 a na konci se ustálila na pH 3,47. Víno bylo 15 dnů po ukončení MLF stočeno a ošetřeno přídatkem 50 mg.l⁻¹ SO₂.

Tabulka 8 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH4, (inokulace na začátku AF kmenem (DSM 7008) VINIFLORA®-OENOS).

Dny		0	3	6	9	12	15
Kyselina L-jablečná	(g.l ⁻¹)	3,05	2,68	1,41	0,64	0,11	0,00
Kyselina L-mléčná	(g.l ⁻¹)	0,11	0,21	1,04	1,82	1,88	1,95
Kyselina octová	(mg.l ⁻¹)	270	380	490	560	580	580
Kyselina citronová	(mg.l ⁻¹)	230	210	190	180	110	0



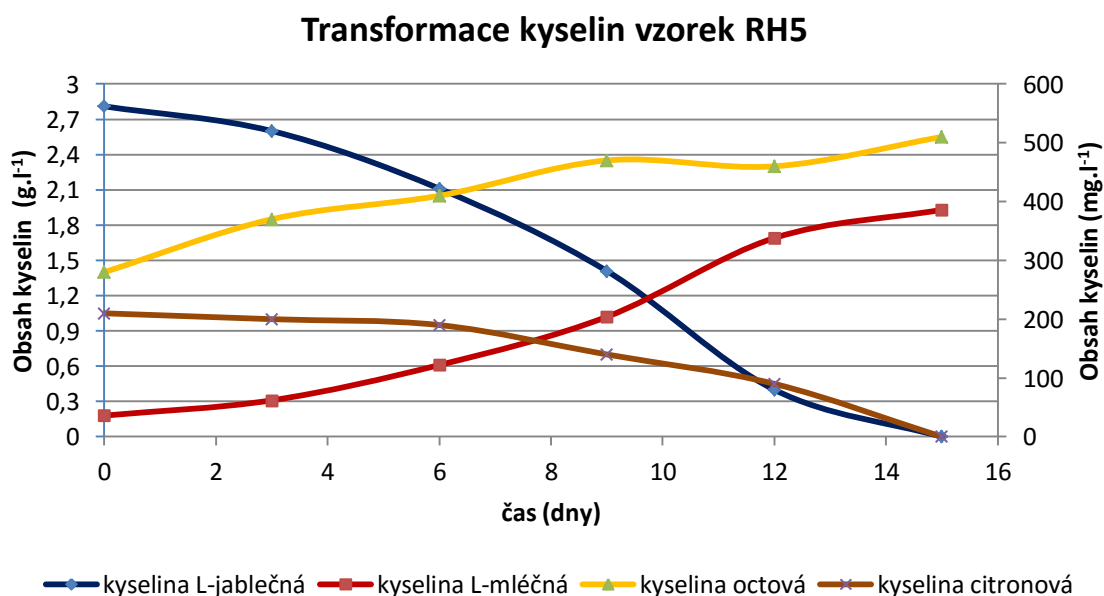
Graf 7 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH4, (inokulace na začátku AF kmenem (DSM 7008) VINIFLORA®-OENOS).

4.3.5 Vzorek RH5

Vzorek RH5 (Tabulka 9; Graf 8) byl inokulovaný ke konci AF bakteriálním kmenem (DSM 7008) VINIFLORA®-OENOS přímo do rmutu. MLF začala dva dny po inokulaci s počátečním pH 3,3, které se v průběhu postupně zvyšovalo až na konečných pH 3,48. Kyselina octová u tohoto vzorku dosáhla až na hodnotu 510 mg.l⁻¹, ale žádným způsobem neovlivnila konečný produkt, víno. Kyselina L-jablečná byla zcela degradována na kyselinu L-mléčnou. Veškerá kyselina citronová byla beze zbytku spotřebována. Víno bylo, tak jako v předchozích případech, 15 dnů po ukončení MLF stočeno a ošetřeno přídatkem 50 mg.l⁻¹ SO₂.

Tabulka 9 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH5, (inokulace ke konci AF kmenem (DSM 7008) VINIFLORA®-OENOS).

Dny		0	3	6	9	12	15
Kyselina L-jablečná	(g.l ⁻¹)	2,81	2,60	2,11	1,41	0,40	0,00
Kyselina L-mléčná	(g.l ⁻¹)	0,18	0,31	0,61	1,02	1,69	1,93
Kyselina octová	(mg.l ⁻¹)	280	370	410	470	460	510
Kyselina citronová	(mg.l ⁻¹)	210	200	190	140	90	0



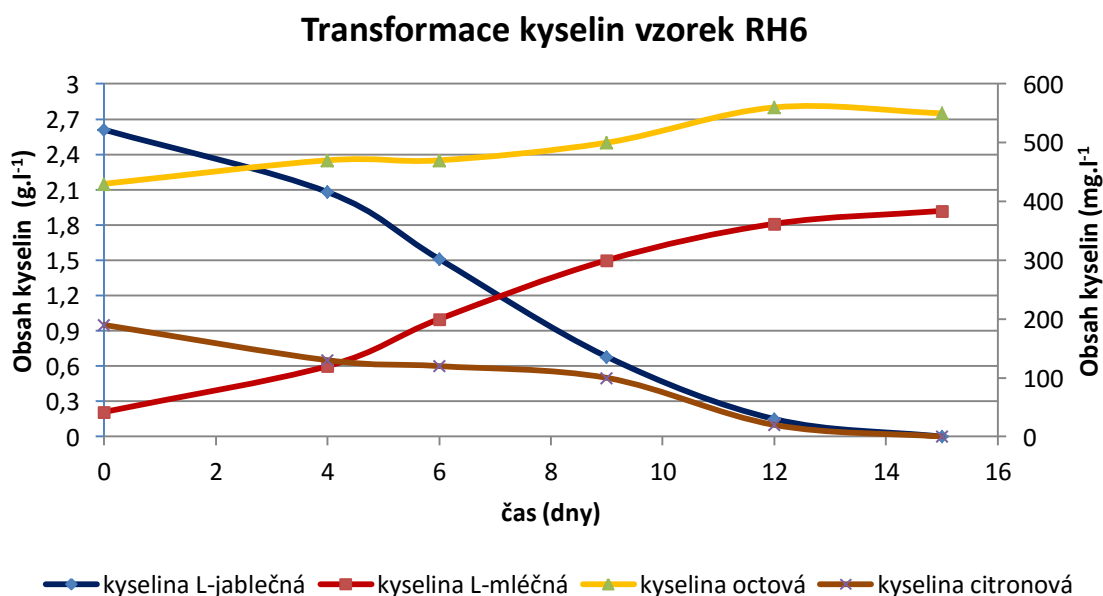
Graf 8 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH5, (inokulace ke konci AF kmenem (DSM 7008) VINIFLORA®-OENOS).

4.3.6 Vzorek RH6

Inokulace bakteriálního kmene (DSM 7008) VINIFLORA®-OENOS u vzorku RH6 (Tabulka 10; Graf 9) proběhla dva dny po AF do odkaleného vína při teplotě 18 °C. MLF trvala celkem 15 dnů a znatelný úbytek kyseliny L-jablečné byl zaznamenán třetí den po inokulaci bakterií. Kyselina L-jablečná byla bakteriemi beze zbytku přeměněna na kyselinu L-mléčnou. Hodnota kyseliny octové se zastavila na hodnotě 550 mg.l⁻¹ a kyselina citronová byla zcela spotřebována. Hodnota pH 3,38 při inokulaci se na konci MLF ustálila na zvýšené hodnotě pH 3,53. Po ukončení MLF bylo víno po 15 dnech stočeno a ošetřeno přídatkem 50 mg.l⁻¹ SO₂.

Tabulka 10 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH6, (inokulace po AF kmenem (DSM 7008) VINIFLORA®-OENOS).

Dny		0	3	6	9	12	15
Kyselina L-jablečná	(g.l ⁻¹)	2,61	2,08	1,51	0,68	0,15	0,00
Kyselina L-mléčná	(g.l ⁻¹)	0,21	0,60	1,00	1,50	1,81	1,92
Kyselina octová	(mg.l ⁻¹)	430	470	470	500	560	550
Kyselina citronová	(mg.l ⁻¹)	190	130	120	100	20	0



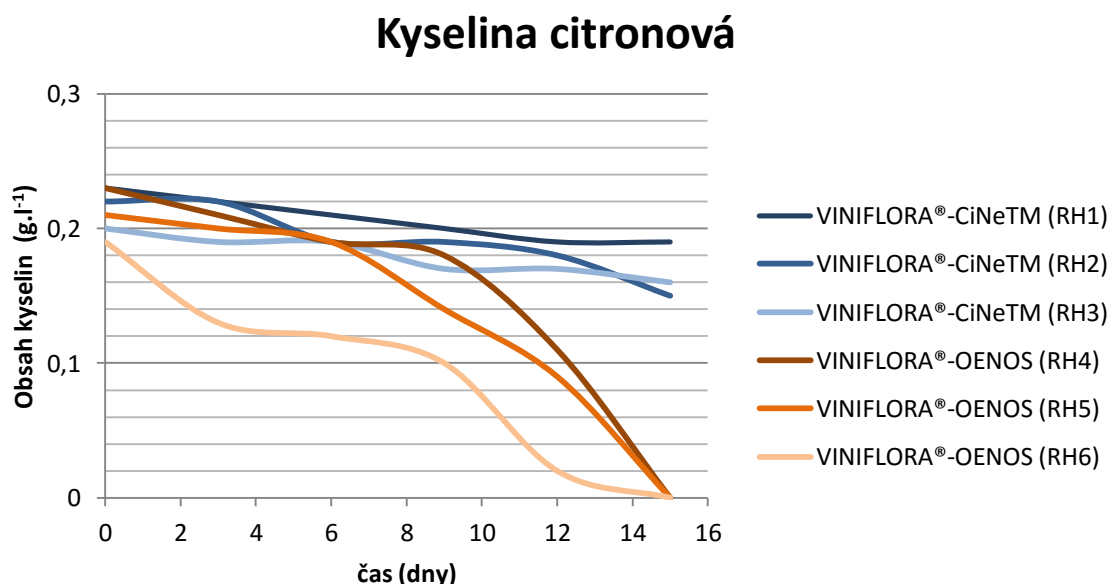
Graf 9 Transformace obsahu kyselin, vzorek RH6, (inokulace po AF kmenem (DSM 7008) VINIFLORA®-OENOS).

4.3.7 Hodnoty kyseliny citronové v průběhu MLF

Naměřené hodnoty (Tabulka 11; Graf 10) potvrdily, že při použití citrát-negativního bakteriálního kmene VINIFLORA®-CiNe™ u pokusných vzorků RH1-3 byla kyselina citronová s nepatrným úbytkem po ukončení MLF zachována. Bakteriální kmen (DSM 7008) VINIFLORA®-OENOS v průběhu MLF u vzorků RH4-6 kyselinu citronovou zahrnul do svého metabolismu a beze zbytku ji spotřeboval. Měření v tomto případě potvrzuje, že za použití citrát-negativních bakterií je kyselina citronová zachována.

Tabulka 11 Spotřeba kyseliny citronové v průběhu MLF bakteriálními kmeny VINIFLORA®-OENOS a VINIFLORA®-CiNe™ s různou dobou inokulace.

Dny		0	3	6	9	12	15
VINIFLORA®-CiNe™ vzorek č.							
Kyselina citronová (g.l ⁻¹)	RH1	0,23	0,23	0,21	0,20	0,19	0,19
	RH2	0,22	0,22	0,19	0,19	0,18	0,15
	RH3	0,20	0,19	0,19	0,17	0,17	0,16
VINIFLORA®-OENOS vzorek č.							
Kyselina citronová (g.l ⁻¹)	RH4	0,23	0,21	0,19	0,18	0,11	0,00
	RH5	0,21	0,20	0,19	0,14	0,09	0,00
	RH6	0,19	0,13	0,12	0,10	0,02	0,00



Graf 10 Spotřeba kyseliny citronové v průběhu MLF bakteriálními kmeny VINIFLORA®-OENOS a VINIFLORA®-CiNe™ s různou dobou inokulace.

4.4 Výsledky senzoričkého hodnocení vína

Hodnocení bylo provedeno na celkový chuťový projev vína (Tabulka 12) a chuťově aromatický profil červených vín (Graf 11-16). Hodnocení provádělo celkem sedm degustátorů. Výsledky byly zprůměrovány a jsou prezentovány v podobě tabulky a grafů.

4.4.1 Senzorické vyhodnocení vína (stobodový systém)

Tabulka 12 znázorňuje celkový průměr dosažených bodů degustace jednotlivých vzorků vína RH1-6 odrůdy Zweigeltrebe. Z tabulky vyplývá, že mezi jednotlivými vzorky není razantní rozdíl a jsou si podobné. Vzhled a barva vína byla u všech hodnocených vzorků obodována maximálním počtem možných bodů. Nepatrné rozdíly v bodovém hodnocení byly u vůně, chuti a celkového dojmu vína. Nejlépe bodově ohodnocené byly vzorky RH3, inokulovaný citrát-negativním bakteriálním kmenem VINIFLORA®-CiNe™, a RH6, inokulovaný bakteriálním kmenem (DSM 7008) VINIFLORA®-OENOS dva dny po alkoholové fermentaci. Na třetím místě se umístil vzorek RH2, inokulovaný citrát-negativním bakteriálním kmenem VINIFLORA®-CiNe™ ke konci alkoholové fermentace, a následně vzorek RH5, inokulovaný bakteriálním kmenem (DSM 7008) VINIFLORA®-OENOS ke konci alkoholové fermentace. Nejmenší bodové ohodnocení vykazovaly vzorky inokulované na začátku alkoholové fermentace spolu s kvasinkami, a to vzorek RH1, inokulovaný citrát-negativním bakteriálním kmenem VINIFLORA®-CiNe™, a RH4, inokulovaný bakteriálním kmenem (DSM 7008) VINIFLORA®-OENOS. Vzorky inokulované citrát-negativními bakteriemi byl v průměru bodově lépe hodnoceny než vzorky inokulované komerčními bakteriemi.

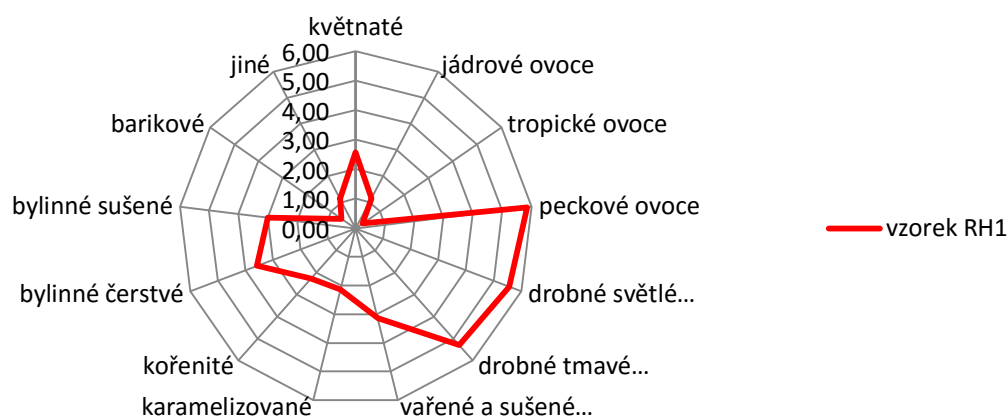
Tabulka 12 Senzorické vyhodnocení vína po MLF (stobodový systém)

	č. vzorku	RH1	RH2	RH3	RH4	RH5	RH6
VZHLED	Čírost	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
	Barva	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
VŮŇĚ	Intenzita	6,43	6,29	6,29	6,14	6,57	6,71
	Čistota	3,71	4,43	4,29	3,71	3,86	4,43
	Harmonie	11,71	12,29	12,29	11,71	12,00	12,57
CHUŤ	Intenzita	6,43	6,57	6,71	6,29	6,43	6,57
	Čistota	3,71	4,14	4,14	3,57	4,00	4,14
	Harmonie	15,14	16,00	16,43	13,86	16,43	16,00
	Perzistence	6,14	6,14	6,14	5,57	6,00	6,14
CELKOVÝ DOJEM		9,14	9,29	9,14	8,71	9,14	9,29
BODY CELKEM		77,43	80,14	80,43	74,57	79,43	80,86

4.4.2 Chut'ově aromatický profil vína

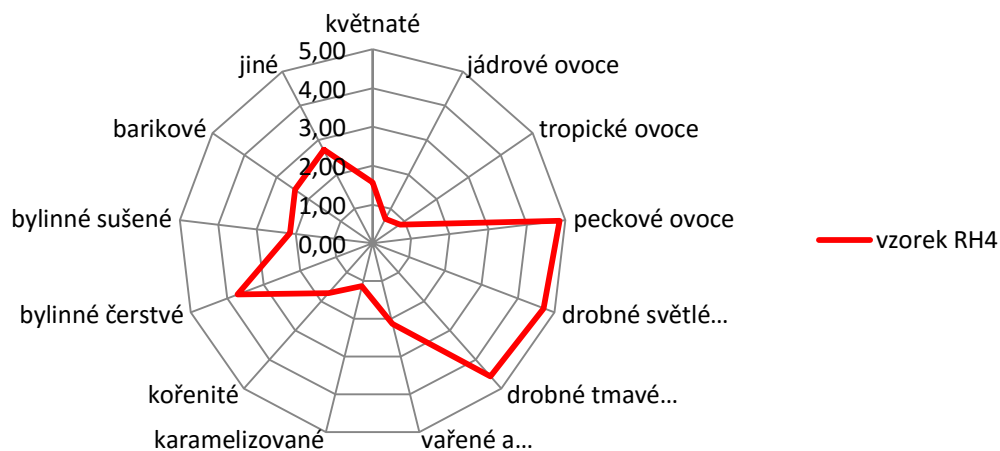
Vzorky RH1 a RH4 byly inokulovány na začátku AF spolu s kvasinkami. Použitím citrát-negativních bakterií k MLF u vzorku RH1 (Graf 11) mělo víno výraznější ovocný charakter peckového a drobného ovoce s projevem květnatých, bylinných až kořenitých a karamelových tónů. Vzorek RH4 (Graf 12), u kterého byla MLF provedena komerčními bakteriemi, se projevoval o něco méně výrazně ovocnými tóny peckového a drobného ovoce. Dále u vzorku RH4 převažovaly spíše bylinné tóny s lehkým projevem dřevitosti a zemitosti.

Aromatický profil vína odrůda Zweigeltrebe vzorek RH1



Graf 11 Aromatický profil, vzorek RH1. Použité bakterie VINIFLORA®-CiNe™ (citrát-negativní), inokulace na začátku AF spolu s kvasinkami.

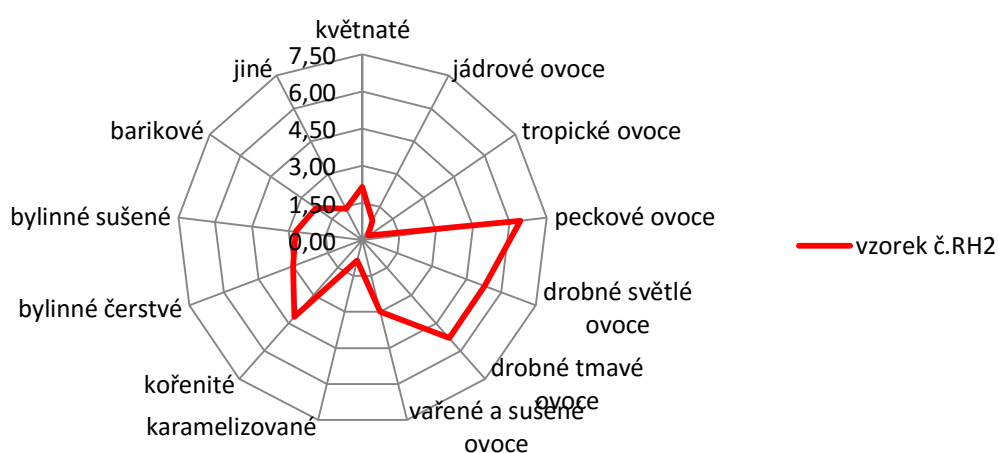
Aromatický profil vína odrůda Zweigeltrebe vzorek RH4



Graf 12 Aromatický profil, vzorek RH4. Použité bakterie VINIFLORA®-OENOS, inokulace na začátku AF spolu s kvasinkami.

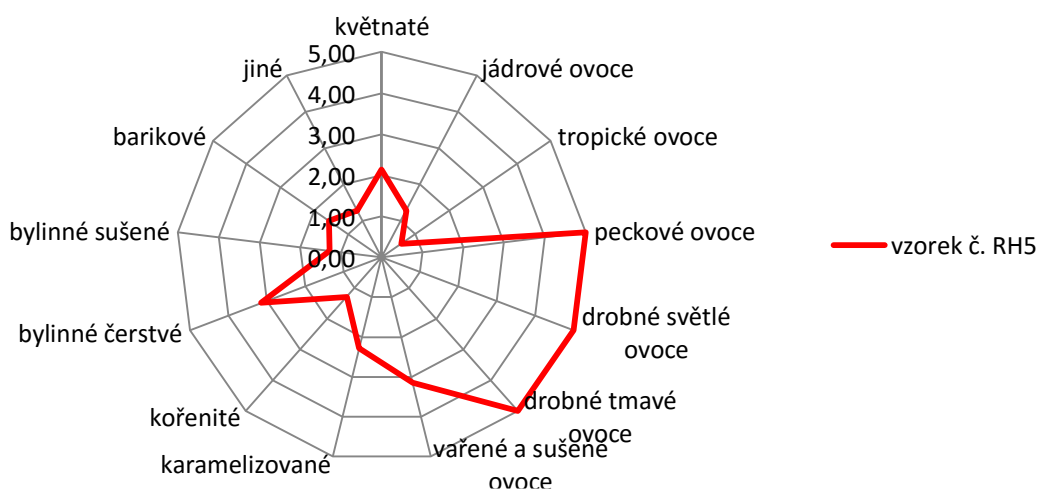
Vzorky RH2 a RH5 byly inokulovány ke konci AF. Vzorek RH2 (Graf 13), inokulovaný citrát-negativními bakteriemi, měl výraznější ovocný charakter peckového a drobného ovoce s převahou peckového ovoce. Kořenitý projev převažoval nad bylinným a květnatým aroma. Vzorek RH5 (Graf 14), inokulovaný komerčními bakteriemi, vykazoval taktéž ovocný charakter s tóny peckového a drobného ovoce, ale ne tak intenzivně jako u vzorku RH2. U vzorku RH5 dále bylinné tóny převažovaly nad květnatostí a lehkou zemitostí. U vzorku RH2, inokulovaného citrát-negativními bakteriemi, je patrná vyšší intenzita ovocného projevu.

Aromatický profil vína odrůdy Zweigeltrebe vzorek RH2



Graf 13 Aromatický profil, vzorek RH2. Použité bakterie VINIFLORA®-CiNe™, (citrát-negativní) inokulace ke konci AF.

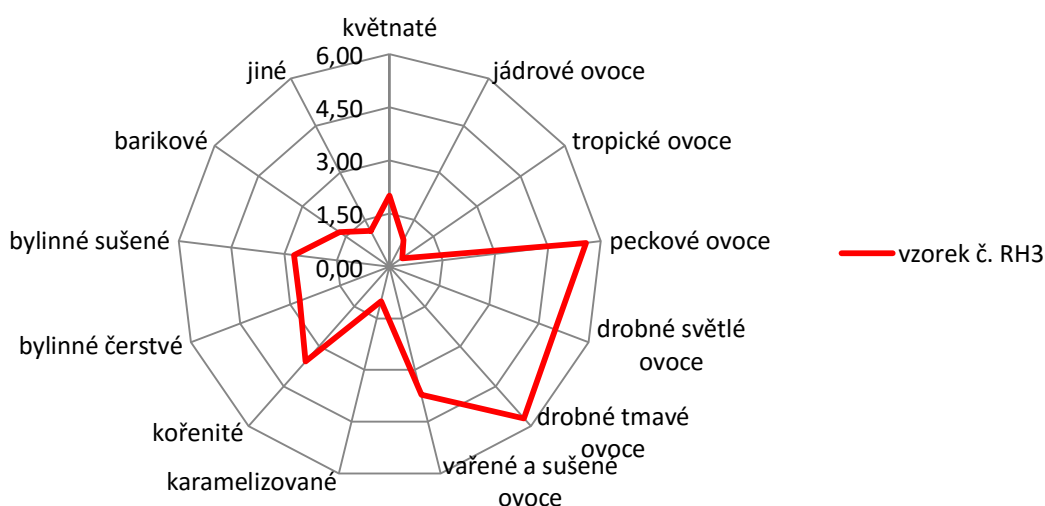
Aromatický profil vína odrůdy Zweigeltrebe vzorek RH5



Graf 14 Aromatický profil, vzorek RH5. Použité bakterie VINIFLORA®-OENOS, inokulace ke konci AF.

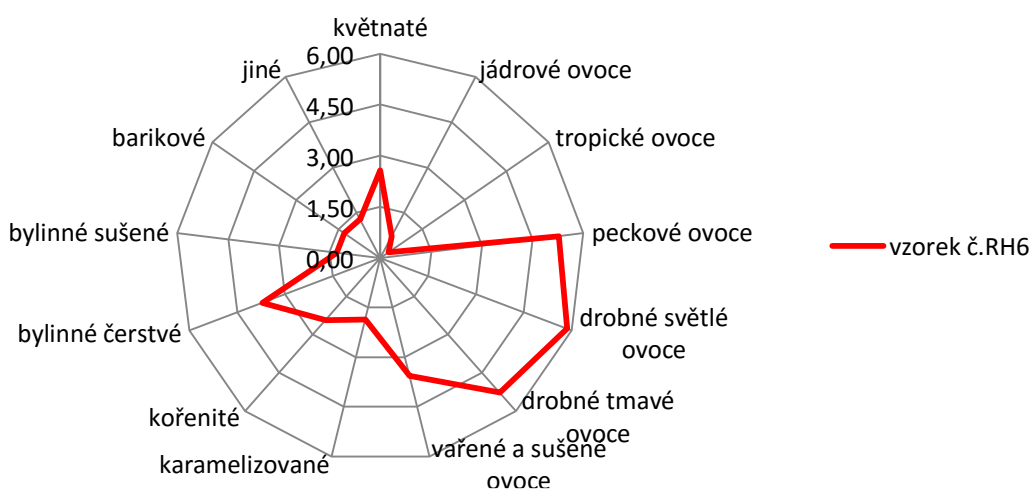
Vzorky RH3 a RH6 byly inokulovány dva dny po AF. Vzorek RH3 (Graf 15) byl inokulovaný citrát-negativními bakteriemi, měl ovocný až kořenitý charakter s bylinnými a květnatými tóny. Vzorek RH6 (Graf 16), inokulovaný komerčními bakteriemi, byl charakterem ovocný a bylinný, stejně jako vzorek RH3. Kořenitost u vzorku RH6 nebyla tak výrazná jako u vzorku RH3. Oproti tomu vzorek RH6 vystupoval s vyšším projevem květnatosti a čerstvých bylin.

Aromatický profil vína odrůdy Zweigeltrebe vzorek RH3



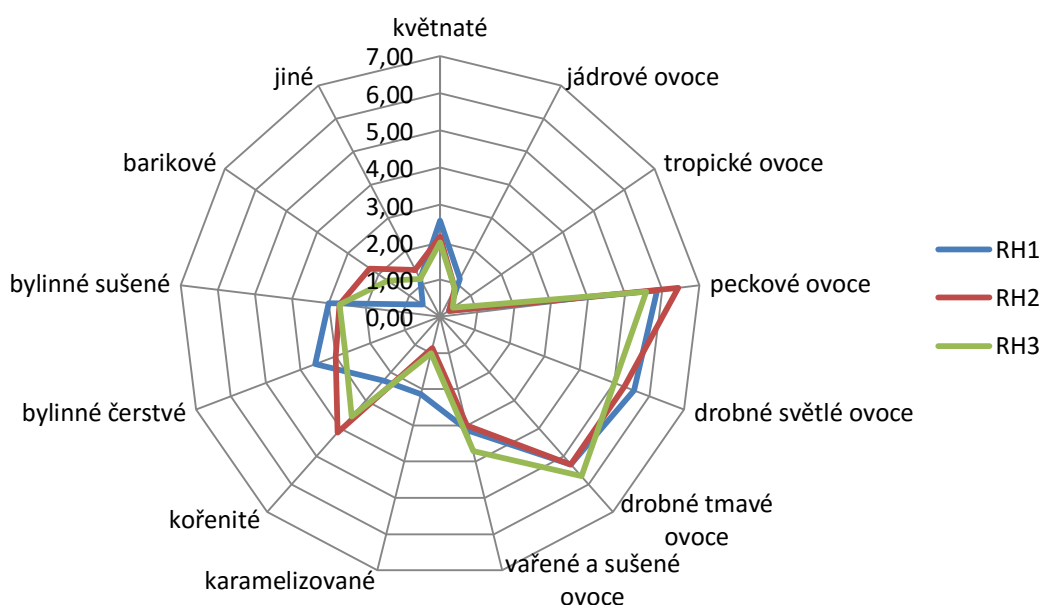
Graf 15 Aromatický profil, vzorek RH3. Použité bakterie VINIFLORA®-CiNe™, (citrát-negativní) inokulace dva dny po AF.

Aromatický profil vína odrůdy Zweigeltrebe vzorek RH6



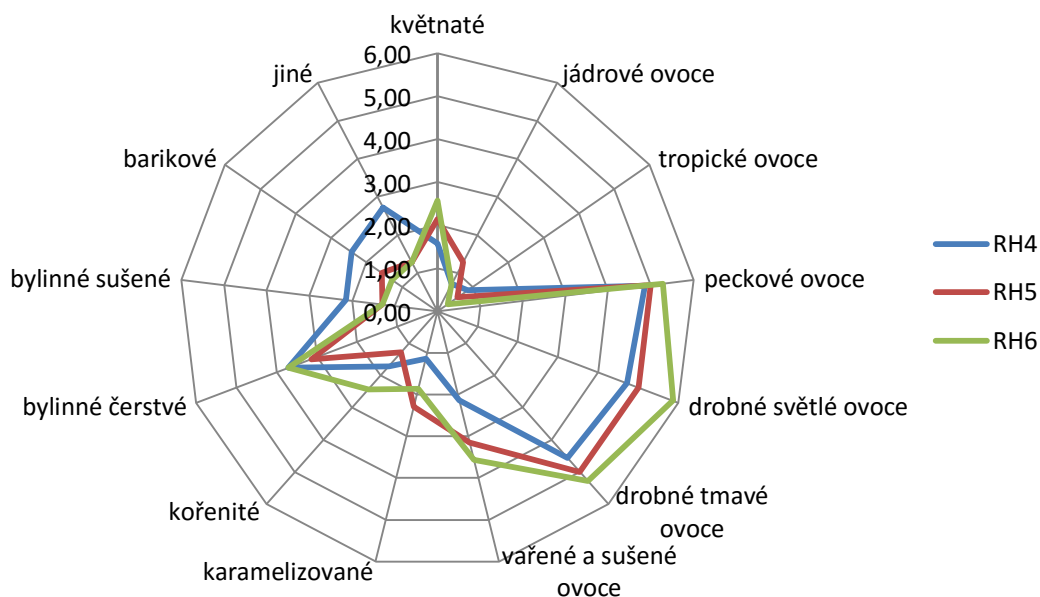
Graf 16 Aromatický profil, vzorek RH6. Použité bakterie VINIFLORA®-OENOS, inokulace dva dny po AF.

Z pozorování vyplynulo, že vína vzorků RH1-3 (Graf 17), inokulovaná citrát-negativními bakteriemi, u kterých proběhla MLF, měla podobný aromatický profil ovocného charakteru peckového a drobného ovoce s bylinnými a květnatými tóny. Vzorek RH1, inokulovaný současně s kvasinkami na začátku AF, byl více orientovaný do bylinných tónů. Vzorek RH2, inokulovaný na konci AF, a vzorek RH3, inokulovaný dva dny po AF, se od sebe výrazně nelišily a oproti vzorku RH1 měly spíše kořenitý charakter. Lze tedy v tomto případě konstatovat, že největší vliv na aromatický profil vína měla inokulace bakterií současně s kvasinkami u vzorku RH1, u kterého převažovaly více bylinné tóny, oproti vzorkům RH2 a RH3, které byly spíše kořenité. Máselné tóny nebyly detekovány ani u jednoho vzorku.



Graf 17 Porovnání vlivu doby inokulace citrát-negativních bakterií na aromatický profil vína odrůdy Zweigeltrebe, vzorky RH1, RH2, RH3.

Vzorky RH4-6, inokulované komerčními bakteriemi (Graf 18), měly společný ovocný charakter peckového a drobného ovoce s tónem čerstvých bylin a květnatosti. Vzorek RH4, inokulovaný na začátku AF spolu s kvasinkami, se spíše projevoval dřevitostí a zemitostí, než u jak tomu bylo u vzorku RH5, inokulovaném na konci AF, a vzorku RH6, inokulovaném dva dny po AF, které měly spíše tón čerstvých bylin. Z Grafu 18 je patrné, že největší rozdíl je u vzorku RH 4, inokulovaného současně s kvasinkami na začátku AF.



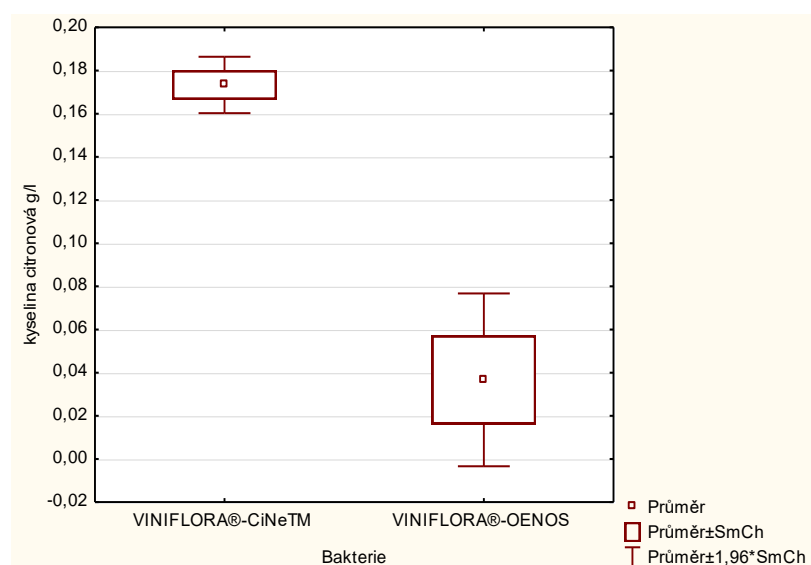
Graf 18 Porovnání vlivu doby inokulace komerčních bakterií na aromatický profil vína odrůdy Zweigeltrebe, vzorky RH4, RH5, RH6.

Porovnáním hodnocení aromatického profilu vín odrůdy Zveigeltrebe vzorků RH1, RH2 a RH3 (Graf 17), inokulovaných citrát-negativními bakteriemi, se vzorky RH4, RH5 a RH6 (Graf 18), inokulovaných komerčními bakteriemi, lze uvést následující vyhodnocení: Vzorky inokulované citrát-negativními bakteriemi byly hodnoceny vyšším počtem bodů za ovocný projev peckového, drobného tmavého a drobného světlého ovoce, než vzorky, u kterých byly použity komerční bakterie. V květnatosti byl minimální rozdíl, až na vzorek RH4, který byl spíše dřevitý a zemitý. Vína byla po použití citrát-negativních bakterií kořenitá, až na vzorek RH1, který byl spíše bylinného charakteru, stejně jako vzorky RH4, RH5 a RH6, inokulované komerčními bakteriemi. Celkový vliv použitých bakterií a doby inokulace bakterií na aromatický profil je nutné však dále zkoumat.

4.5 Statistická analýza

4.5.1 Obsah kyseliny citronové u bakteriálního kmene VINIFLORA®-CiNe™ a VINIFLORA®-OENOS po MLF

Krabicový graf (Graf 19) prokazuje, že po MLF se u bakteriálního kmene VINIFLORA®-OENOS celkový obsah kyseliny citronové razantně snížil a u citrát-negativního bakteriálního kmene VINIFLORA®-CiNe™ byla kyselina citronová z velké části s malou variabilitou zachována. T-test (tabulka 14) prokázal statisticky významné hodnoty pro rozdíl obsahu kyseliny citronové po MLF pro oba bakteriální kmeny. Pravděpodobnost v tomto případě byla stanovena na $p < 0,05$.



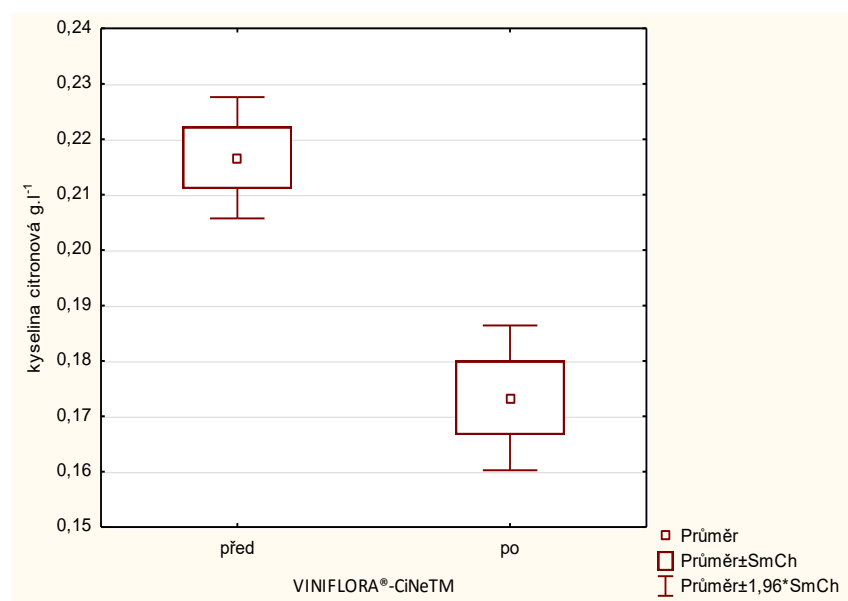
Graf 19 Krabicový graf porovnání obsahu kyseliny citronové u bakteriálních kmenů VINIFLORA®-CiNe™ a VINIFLORA®-OENOS po MLF

Tabulka 13 T-test kyseliny citronové pro oba kmeny po MLF

	VINIFLORA®-CiNe™	VINIFLORA®-OENOS
Průměr	0,173333	0,036667
Směrodatná odchylka	0,016330	0,050067
Počet platných	6	6
Rozdíl		0,136667
p rozptyly		0,028001
t		6,356780
sv		10
p		0,000083
Pravděpodobnost - 95.000%		0,088763
Pravděpodobnost +95.000%		0,184570

4.5.2 Celková změna průměrného obsahu kyseliny citronové u bakteriálního kmene VINIFLORA®-CiNe™

Krabicový graf (Graf 20) znázorňuje, že po MLF za použití citrát-negativního bakteriálního kmene se obsah kyseliny citronové s malou variabilitou snížil minimálně. T-test (tabulka 14) u kyseliny citronové pro kmen VINIFLORA®-CiNe™ prokázal statisticky významné hodnoty rozdílu obsahu kyseliny citronové před a po MLF. Pravděpodobnost v tomto případě byla stanovena na $p < 0,05$.



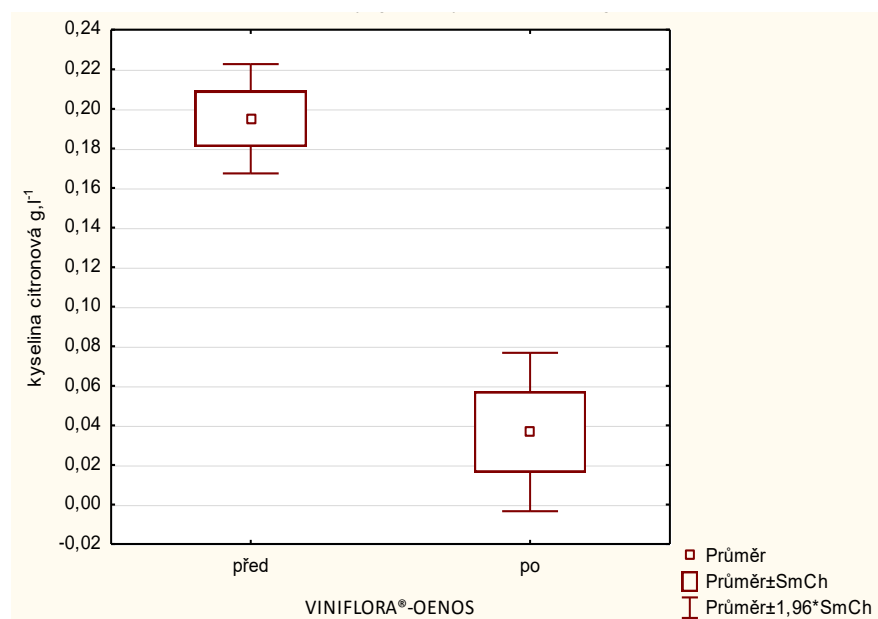
Graf 20 Krabicový graf průměrného obsahu kyseliny citronové u bakteriálního kmene VINIFLORA®-CiNe™ před a po MLF

Tabulka 14 T-test kyseliny citronové pro bakteriální kmen VINIFLORA®-CiNe™

	Před MLF	Po MLF
Průměr	0,216667	0,173333
Směrodatná odchylka	0,013663	0,016330
Počet platných	6	6
Rozdíl		0,04333
p rozptyly		0,705057
t		4,103259
sv		10
p		0,000602
Pravděpodobnost - 95.000%		0,023966
Pravděpodobnost +95.000%		0,062701

4.5.3 Celková změna průměrného obsahu kyseliny citronové u bakteriálního kmene VINIFLORA®-OENOS

Krabicový graf (Graf 21) znázorňuje, že došlo po MLF k razantnímu snížení celkového průměrného obsahu kyseliny citronové až celkové spotřebě. T-test (tabulka 14) u kyseliny citronové pro kmen VINIFLORA®-OENOS prokázal statisticky významné hodnoty rozdílu obsahu kyseliny citronové před a po MLF. Pravděpodobnost v tomto případě byla stanovena na $p < 0,05$.



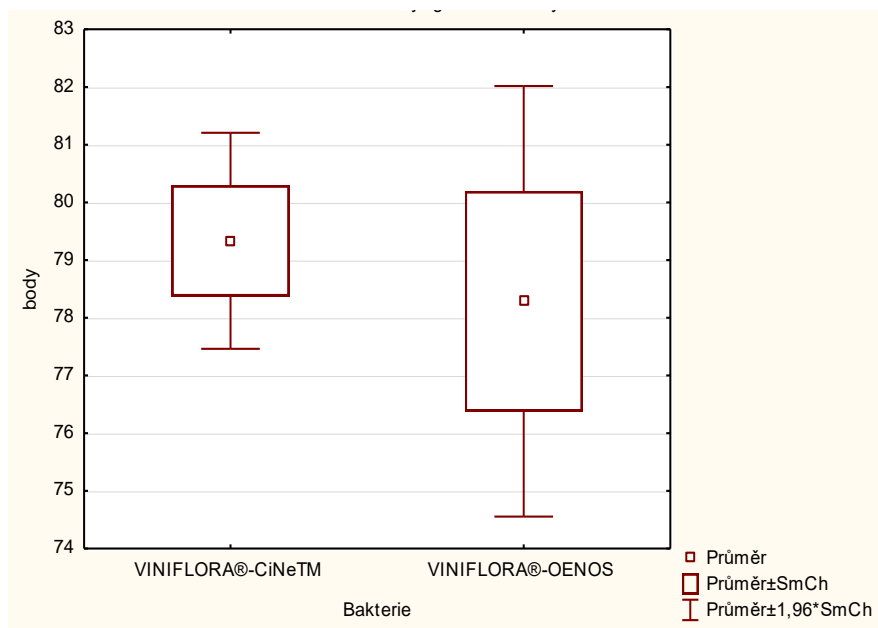
Graf 21 Krabicový graf průměrného obsahu kyseliny citronové u bakteriálního kmene VINIFLORA®-OENOS před a po MLF

Tabulka 15 T-test kyseliny citronové pro kmen VINIFLORA®-OENOS

	Před MLF	Po MLF
Průměr	0,195000	0,036667
Směrodatná odchylka	0,034496	0,050067
Počet platných	6	6
Rozdíl		0,158333
p rozptyly		0,432949
t		6,378857
sv		10
p		0,000080
Pravděpodobnost - 95.000%		0,103027
Pravděpodobnost +95.000%		0,213639

4.5.4 Senzorické hodnocení 100-bodový systém

Krabicový graf (graf 22) znázorňuje, že vína inokulovaná bakteriálním kmenem VINIFLORA®-CiNe™ získala v průměru vyšší bodové ohodnocení s menší variabilitou než vína inokulovaná kmenem VINIFLORA®-OENOS které byla hodnocena s větším bodovým rozdílem. T-test (tabulka 15) v tomto případě nevyšel. Pravděpodobnost byla stanovena na $p > 0,05$.



Graf 22 Krabicový graf 100 bodové hodnocení vín po MLF

Tabulka 16 T-test senzoričkého hodnocení 100-bodový systém

	VINIFLORA®-CiNe™	VINIFLORA®-OENOS
Průměr (body)	79,33333	78,28667
Směrodatná odchylka	1,654700	3,297186
Počet platných	3	3
Rozdíl		1,046667
p rozptyly		0,402372
t		0,491415
sv		4
p		0,648877
Pravděpodobnost - 95.000%		-4,86689
Pravděpodobnost +95.000%		6,960227

5 Diskuze

S ohledem na hospodářský význam MLF je pro vinařství zajímavým cílem používání nových kmenů *Oenococcus oeni*. Práce zkoumala vliv doby inokulace na průběh MLF v červeném víně odrůdy Zweigeltrebe se dvěma bakteriálními kmeny, jedním negativním ke kyselině citronové VINIFLORA®-CiNeTM a druhým, který tuto vlastnost nemá, VINIFLORA®-OENOS.

HENICK-KLING, 1995 uvádí, že inokulace větší bakteriální populace 10^{11} CFU.ml⁻¹ všeobecně zrychlují nástup a délku trvání MLF. U všech pokusných vzorků při inokulované populaci 10^{11} CFU.ml⁻¹ začala MLF do 48 hodin, nezávisle na době inokulace a druhu bakteriálního kmene. Rozdíly pak nastaly až v rychlosti degradace kyseliny L-jablečné. Vzorky RH2 a RH5 s dobou inokulace ke konci AF měly delší dobu nástupu MLF, křivka rychlosti spotřeby kyseliny L-jablečné na začátku a až do dvou třetin trvání MLF byla pozvolná a ke konci měla strmější charakter. Vzorky RH1 a RH4, inokulované na začátku AF současně s kvasinkami, měly křivku rychlosti spotřeby kyseliny L-jablečné od začátku strmější a ke konci se křivka narovnávala a MLF trvala nejkratší dobu. U vzorků RH3 a RH6, inokulovaných dva dny po AF, byl už patrný rozdíl i mezi bakteriálními kmeny. Citrát-negativní bakteriální kmen VINIFLORA®-CiNeTM měl razantnější nástup MLF, pomalejší středovou část a strmý konec. Bakteriální kmen VINIFLORA®-OENOS měl pomalý nástup MLF, rychlý průběh a pomalý konec. V tomto případě lze říci, že na průběh MLF nemá vliv jen počáteční populace bakterií, ale i doba načasování inokulace bakterií a druh bakteriálního kmene. Délka trvání MLF nepřekročila 15 dnů u obou použitých bakteriálních kmenů.

RIBÉREAU-GAYON a další, 2006 uvádí, že podmínky prostředí, zejména pH a výběr správného bakteriálního kmene, nebo kombinace bakteriálního a kvasinkového kmene ke společné inokulaci hrají důležitou roli ve vývoji MLF. Práce nepotvrdila negativní vliv kvasinek na vybrané bakteriální kultury a vývoj MLF. Na začátku MLF bylo počáteční pH 3,30 až pH 3,38 a ke konci se hodnoty ustalovaly na hodnotách do pH 3,5. Hodnoty pH v tomto případě neměly negativní vliv na začátek, průběh ani konec MLF.

Chr. Hansen A/S u svého nového bakteriálního kmene *Oenococcus oeni* VINIFLORA®-CiNeTM uvádí, že nezahrnuje do svého metabolismu kyselinu citronovou.

Měření obsahu kyseliny citronové u vzorků RH1, RH2 a RH3 dokazují, že kyselina citronová byla z velké části po provedení MLF ve víně zachována. Vzorky RH4, RH5 a RH6, u kterých k MLF byl použit bakteriální kmen VINIFLORA®-OENOS, měly po provedení MLF obsah kyseliny citronové na nulové hodnotě. Lze konstatovat, že komerční druhy bakterií, které nemají vlastnost zachovat kyselinu citronovou ve víně, ji z velké části nebo zcela spotřebují.

BARTOWSKY, a další, 2011 uvádí, že některé kmeny u červených vín vykazují zvýšenou produkci aroma červených bobulí a ovoce. Výsledky sensorického hodnocení mluví ve prospěch vzorků inokulovaných citrát-negativním kmenem VINIFLORA®-CiNe™, které měly v průměru nejlepší bodové ohodnocení. Největší vliv doby inokulace na aromatický profil vína vykazovaly vzorky inokulované na začátku AF současně s kvasinkami, které se nejvíce lišily od vzorků inokulovaných ke konci a po AF. Vzorky, inokulované ke konci a po AF, u každého použitého bakteriálního kmene vykazovaly určitou podobnost. Výsledná vína a hodnocení aromatického profilu tohoto pokusu byla ovlivněna dobou inokulace bakterií. Lze potvrdit v tomto případě ovlivnění. Laktátní tóny nebyly zaznamenány u žádného vzorku.

Práce porovnávala několik způsobů provedení MLF dvěma bakteriálními kmeny různé povahy a sledovala průběh MLF. Je však třeba ještě dalšího výzkumu, protože práce sledovala tyto vlivy jen ve víně červené odrůdy Zweigeltrebe.

6 Závěr

Diplomová práce byla zpracována na téma „*Vliv doby inokulace na průběh malolaktické fermentace*“. MLF (malolaktická fermentace) byla prováděna a sledována u jednoho druhu vína odrůdy Zweigeltrebe. K provedení MLF byly použity dva bakteriální kmeny, jeden negativní ke kyselině citronové VINIFLORA®-CiNeTM a druhý, který tuto vlastnost nemá, VINIFLORA®-OENOS. Víno bylo rozděleno do šesti pokusných vzorků, pro každý bakteriální kmen tři vzorky s různou dobou inokulace. Inokulace bakterií proběhla na začátku, ke konci a po AF (alkoholové fermentaci).

Degradace kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou byla měřením prokázána u všech vzorků. Kyselina L-jablečná byla u všech vzorků beze zbytku přeměněna na kyselinu L-mléčnou. Nejrychleji proběhla MLF u vzorků inokulovaných na začátku AF.

Kyselina citronová v průběhu MLF při použití bakteriálního kmene VINIFLORA®-OENOS byla beze zbytku spotřebována. V případě citrát-negativního kmene VINIFLORA®-CiNeTM, který nezahrnuje kyselinu citronovou do svého metabolismu v průběhu MLF, měření prokázala, že kyselina citronová zůstala zachována.

Senzorické vyhodnocení provedlo sedm hodnotitelů. Hodnocení probíhalo stobodovým systémem k celkovému projevu vína. Hodnocení bylo velmi blízké a nejvyšší bodový průměr získaly vzorky inokulované citrát-negativní bakteriální kulturou.

Aromatický profil byl u červeného vína odrůdy Zweigeltrebe hodnocen v rozmezí intenzity 1 až 10. Hodnocené deskriptory byly květnatost, jádrové ovoce, tropické ovoce, peckové ovoce, drobné světlé ovoce, drobné tmavé ovoce, vařené a sušené ovoce, karamelizace, kořenitost, chuť a vůně bylinná (čerstvá), bylinná (sušená), barik a jiné. Intenzivnější ovocný profil peckového a drobného ovoce měla vína s použitými bakteriemi VINIFLORA®-CiNeTM, kde doba inokulace měla ve všech případech minimální vliv.

Statistická analýza neprokázala žádný významný rozdíl mezi použitými bakteriemi. Závěrem lze říci, že lepších výsledků bylo dosaženo použitím citrát-negativního bakteriálního kmene VINIFLORA®-CiNeTM.

7 Souhrn

Malolaktická fermentace působí na víno snížením kyselosti a zlepšením mikrobiální stability a aromatických vlastností vína. Malolaktickou fermentaci lze provádět před alkoholovou fermentací, v průběhu, na konci alkoholové fermentace a po ní. Vždy záleží na situaci a typu vína.

Diplomová práce se v literární části zabývala malolaktickou fermentací, bakteriemi malolaktické fermentace a jejími druhy, načasováním inokulace mléčných bakterií a procesy a vlivy působícími na průběh malolaktické fermentace s následným ovlivněním vlastností vína.

Praktická část byla založena na různých způsobech provádění malolaktické fermentace, na inokulaci mléčných bakterií pozitivních a negativních ke kyselině citronové současně s kvasinkami na začátku alkoholové fermentace, na konci s využitím zbytkového tepla a po alkoholové fermentaci do vína. Tato část sledovala změny hodnot probíhající malolaktické fermentace a na závěr porovnávala senzoričké vyhodnocení výsledných produktů.

Klíčová slova:

Malolaktická fermentace, mléčné bakterie, citrát-negativní bakterie, organické kyseliny.

8 Resume

Malolactic fermentation effects on wine by acidity reducing and improving of microbial stability and aromatic characteristics of wine. Malolactic fermentation can be performed before alcoholic fermentation, during and at the end of alcoholic fermentation and after. It always depends on the situation and type of wine.

This diploma thesis dealt in literary part with malolactic fermentation, malolactic fermentation bacteria and its types, timing of the lactic acid bacteria inoculation and with processes and influences affecting on the course of malolactic fermentation with consequent effects on characteristics of wine.

The practical part was based on different ways of malolactic fermentation implementing, on inoculation of lactic acid bacteria, which are positive and negative to citric acid, together with yeast at the start of alcoholic fermentation, at the end with using of residual heat, and after alcohol fermentation in wine. This part monitored value changes in ongoing malolactic fermentation and finally compared sensory evaluation of resulting products.

Keywords:

Malolactic fermentation, lactic bacteria, citrate-negative bacteria, organic acids.

9 Seznam použité literatury

BABÍKOVÁ , Petra. 2010. *Vinařská mikrobiologie: pracovní sešit*. Brno : Mendelova univerzita v Brně, 2010. str. 58. ISBN 987-80-7375-465-5.

Bacterial growth pl.svg: M.Komorniczak . 2011. Wikimedia Commons. *Bacteria growth pl.svg: Růstová křivka buněčné kultury*. [Online] 20. duben 2011. [Citace: 30. prosinec 2015.]

https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3ABacterial_growth_cs.svg?uselang=cs.

BALÍK, Josef. 2004. *Vinařství: návody do laboratorních cvičení*. Brno : Mendelova univerzita v Brně, 2004. str. 96. ISBN 978-80-7157-933-5.

BARTOWSKY, Eveline J. a BORNEMAN, Anthony R. 2011. Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Applied microbiology and biotechnology*. 2011, Sv. 92, 3, stránky 441-447.

BARTOWSKY, EVELINE J. a I. LEIGH FRANCIS, JENNIFER R. BELLON, PAUL A. HENSCHKE. 2002. Is buttery aroma perception in wines predictable from the diacetyl concentration. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2002, Sv. 8, 3, stránky 180-185.

BEDNÁŘ, M., a další. 1996. *Lékařská mikrobiologie (Bakteriologie, virologie, parazitologie)*. Praha 2 : Triton, 1996.

BOUSBOURAS, George E. a KUNKEE, Ralph E. 1971. Effect of pH on malo-lactic fermentation in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1971, Sv. 22, 3, stránky 121-126.

bpej.vumop.cz. 2015. eKatalog BPEJ. [Online] Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy, v.v.i., 2015. [Citace: 10. 2 2016.] <http://bpej.vumop.cz/32411>.

CAPUCHO, I. a SAN ROMAO, M. V. 1994. Effect of ethanol and fatty acids on malolactic activity of *Leuconostoc oenos*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1994, Sv. 42, 2-3, stránky 391-395.

- CARRETÉ, Ramon a M.Teresa Vidal, Albert Bordons, Magda Constantí. 2002. Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiology Letters*. 2002, Sv. 211, 2, stránky 155-159.
- CIEZACK, G., L. Hazo, G. Chambat, A. Heyraud, A. Lonvaud-Funel, and M. Dols-Lafargue. 2010. Evidence for exopolysaccharide production by *Oenococcus oeni* strains isolated from non-ropy wines. *Journal of applied microbiology*. 2010, Sv. 108, 2, stránky 499-509.
- CLAESSON, Marcus a Douwe VAN SINDEREN a Paul W. O'TOOLE. 2007. The genus *Lactobacillus* a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiology Letters*. 2007, 269(1), stránky 22-28.
- COSTELLO, P. J., FRANCIS, I. L. a BARTOWSKY, E. J. 2012. 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. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2012, Sv. 8, 3, stránky 287-301.
- COSTELLO, Peter J. a HENSCHKE, Paul A. 2002. Mousy off-flavor of wine: Precursors and biosynthesis of the causative N-heterocycles 2-ethyltetrahydropyridine, 2-acetyltetrahydropyridine, and 2-acetyl-1-pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002, Sv. 50, 24, stránky 7079-7087.
- DAVIS, C. R., D. Wibowo, R. Eschenbruch, T. H. Lee, G. H. Fleet. 1985. Practical implications of malolactic fermentation: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1985, Sv. 36, 4, stránky 290-301.
- DELLAGLIO, F., DICKS, L. M. T. a TORRIANI, S. 1995. The genus *Leuconostoc*. [autor knihy] B.J.B. WOOD a W.H. HOLZAPFEL. *The genera of lactic acid bacteria*. místo neznámé : Springer Science+Business Media Dordrecht, 1995, stránky 235-278.
- DESENS, C. a A, Lonvaud Funel. 1988. Etude de la constitution lipidique des membranes de bacteries lactiques utilisees en vinification. *Connaissance de la Vigne et du Vin*. 1988, 22, stránky 25-32.
- EDER, Reinhard a et al. 2006. *Vady vína*. 1. Valtice : Národní vinařské centrum, 2006. str. 263. ISBN 80-903-2016-3.

- FARKAŠ, J. 1983. *Biotechnologia vína*. 2. Bratislava : Alfa, 1983. str. 984.
- FERAIN, T. a J. N. HOBBS, JR., J. RICHARDSON, N. BERNARD, D. 1996. Knockout of the Two *ldh* Genes Has a Major Impact on Peptidoglycan Precursor Synthesis in *Lactobacillus plantarum*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 1996, Sv. Vol. 178, no. 18, stránky 5431–5437.
- FUGELSANG, Kenneth C. a Edwards, Charles G. 2007. *WINE MICROBIOLOGY Practical Applications and Procedures*. 2. New York : Springer, 2007. str. 393. ISBN: 978-0-387-33349-6.
- GARAI-IBABE a Ibarburu I., Berregi I., Claisse O., Lonvaud-Funel A., Irastorza A., Duenas M. T. 2008. Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking. *International journal of food microbiology*. 2008, Sv. 121, 3, stránky 253-261.
- GARCÍA-RUIZ, Almudena, a další. 2011. Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of enological lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*. 2011, Sv. 145, 2, stránky 426-431.
- GARVIE, E. I. 1986. Genus *Leuconostoc*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 1986, stránky 1071-1075.
- GOTTSHALK, G. 1986. *Bacterial Metabolism*. 2. New York : Springer-Verlag, 1986. ISBN:987-1-4612-7003-4.
- GUERRINI, Simona a Silvia Mangani, Lisa Granchi, Massimo Vincenzini. 2002. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Current microbiology*. 2002, Sv. 44, 5, stránky 374-378.
- HENICK-KLING, T. 1995. Control of malo-lactic fermentation in wine: energetics, flavour modification and methods of starter culture preparation. *Journal of applied bacteriology*. Oxford[J. APPL. BACTERIOL.], 1995, 79, stránky 29–37.
- HEPING, Zhang a Cai, Ymin. 2014. *Lactic acid bacteria: fundamentals and practice*. Dordrecht : Springer Netherlands, 2014. ISBN 978-94-017-8841-0.
- HOLZAPFEL, Wilhelm. H., Johann A. BJÖRKROTH a Leon M. T. DICKS. 1992. *Leuconostoc*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1992.

<http://bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm>. 2012. [Online] 2012. [Citace: 8. březen 2016.] <http://bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm>.

<http://www.hplc.cz/>. 2013. www.hplc.cz. [Online] 2013. [Citace: 10. 2 2016.] <http://www.hplc.cz/>.

HUDECOVÁ, Daniela a Šimkovič, Martin. 2009. *MIKROBIOLÓGIA*. Bratislava : Slovenská technická univerzita v Bratislave v Nakladateľstve STU, 2009. ISBN 978-80-227-3194-2.

JACKOWETZ, J. N. a DE ORDUÑA, R. Mira. 2012. Metabolism of SO₂ binding compounds by *Oenococcus oeni* during and after malolactic fermentation in white wine. *International journal of food microbiology*. 2012, Sv. 155, 3, stránky 153-157.

KAPRÁLEK, František. 1986. *Fyziologie bakterií*. 1. Praha : státní pedagogické nakladatelství, 1986. Učebnice pro vysoké školy, 66-03-27/1.

KLANDER, O. a WEISS, N. 1986. Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods In: Sneath, PHA; Mair, NS; Sharpe, ME; Holt, JG. *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. 1986, stránky 1208-1234.

KÖNIG, Helmut, Uden, Gottfried a Fröhlich, Jürgen. 2009. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Berlin : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009. ISBN: 978-3-540-85462-3.

LAFON-LAFOURCADE, S., Carre, E. a Ribéreau-Gayon, P. 1983. Occurrence of Lactic Acid Bacteria During the Different Stages of Vinification and Conservation of Wines. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 1983, vol. 46, stránky 874-880.

LONVAUD-FUNEL, A. a JOYEUX, A. 1993. Antagonism between lactic acid bacteria of wines: inhibition of *Leuconostoc oenos* by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*. *Food microbiology*. 1993, Sv. 10, 5, stránky 411-419.

LOUIBERE , P, a další. 1992. Electrogenic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* grown on glucose-malate mixtures. *Journal of bacteriology*. 1992, Sv. 174, 16, stránky 5302-5308.

MAITRE, Magali a Stéphanie Weidmann, Aurélie Rieu, Daphna Fenel, Guy Schoehn, Christine Ebel, Jacques Coves, Jean Guzzo. 2012. The oligomer plasticity of the small

heat-shock protein Lo18 from *Oenococcus oeni* influences its role in both membrane stabilization and protein protection. *Biochemical Journal*. 2012, Sv. 444, 1, stránky 97-104.

MINÁRIK, E. a ŠVEJCAR, V. 1981. *Vinařství: Mikrobiologie hroznů a vína*. 2. Brno : Ediční středisko VŠZ, 1981.

MOZZI, Fernanda, Raya, Raúl R. a Vignolo, Graciela M. . 2010. *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*. USA : Wiley-Blackwell, 2010. ISBN: 978-0-813-81583-1.

OSBORNE, J. P., DUBÉ MORNEAU, A. a MIRA DE ORDUNA, R. 2006. Degradation of free and sulfur-dioxide-bound acetaldehyde by malolactic lactic acid bacteria in white wine. *Journal of applied microbiology*. 2006, Sv. 101, 2, stránky 474-479.

PAVLOUŠEK, Pavel. 2010. *Výroba vína u malovinarů*. 2. Praha : Grada publishing, 2010. ISBN 978-80-247-3487-3.

RAI, V. Ravishankar a Bai, Jamuna A. 2015. *Beneficial microbes in fermented and functional foods*. Boca Raton : CRC Press, 2015. ISBN 978-1-4822-0663-0.

REYNOLDS, Andrew G. 2010. *Managing wine quality: Volume 2: Oenology and wine quality*. 1. Cambridge : Woodhead Publishing Limited, 2010. ISBN 978-1-84569-998-7.

RIBÉREAU-GAYON, Pascal, a další. 2006. *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications*. 2. Hoboken : John Wiley & Sons Ltd, 2006. ISBN: 0-470-01034-7.

RITT, J.-F., M. GUILLOUX-BENATIER, J. GUZZO, H. ALEXANDRE a F. REMIZE. 2007. Oligopeptide assimilation and transport by *Oenococcus oeni*. *Journal of applied microbiology*. 2007, Sv. 104, 2., stránky 573-580.

ROSI, Iolanda, NANNELLI, Francesca a GIOVANI, Giovanna. 2009. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation of wines obtained using different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT-Food Science and Technology*. 2009, Sv. 42, 2, stránky 525-530.

SAGUIR, F. M. a MANCA DE NADRA, M. C. 2002. Effect of l-malic and citric acids metabolism on the essential amino acid requirements for *Oenococcus oeni* growth. *Journal of applied microbiology*. 2002, Sv. 93, 2, stránky 259-300.

SALMINEN, Seppo, Atte von Wright a Ouwehand, Arthur . 2004. *Lactic Acid Bacteria: microbiological and functional aspects*. 3. New York : Marcel Dekker, Inc., 2004. ISBN: 0-8247-5332-1.

STEIDL, Robert a RENNER, Wolfgang. 2006. *Moderní příprava červeného vína*. 2. Valtice : Národní vinařské centrum, 2006. str. 72. ISBN 80-903-2017-1.

ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. 2008. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. Praha : Academia, 2008. ISBN 978-802-0017-031.

TORRIANI, Sandra, FELIS, Giovanna E. a FRACCHETTI, Fabio. 2011. Selection criteria and tools for malolactic starters development: an update. *Annals of microbiology*. 2011, Sv. 61, 1, stránky 33-39.

UGLIANO, Maurizio, GENOVESE, Alessandro a MOIO, Luigi. 2003. Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, Sv. 51, 17, stránky 5073-5078.

VLKOVÁ, Eva, RADA, Vojtěch a KILLER, Jiří. 2009. *Potravinářská mikrobiologie*. 2. Praha : Česká zemědělská univerzita, 2009. ISBN 978-80-213-1988-2.

VOTAVA, Miroslav. 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. . Brno : Neptun, 2005. ISBN 80-868-5000-5.

www.biopro.cz. 2016. Analýza vína pomocí FT-IR analyzátoru Bruker Alpha .
www.biopro.cz. [Online] O.K.SERVIS BioPro, s.r.o., 2016. [Citace: 5. 2 2016.]
<http://www.biopro.cz/bulletin/bulletin-vinari/analyza-vina-pomoci-ft-ir-analyzatoru-bruker-alpha/>.

www.brukeroptics.cz. 2016. Produkty. [Online] OPTIK INSTRUMENTS s.r.o., 2016.
[Citace: 5. 2 2016.]
http://www.brukeroptics.cz/component/option,com_katalog/Itemid,84/por,1/produkt_id,1/tab,2/.

www.geologicke-mapy.cz. 2016. Geologie, radon a geologická mapa Lipov. *www.geologicke-mapy.cz*. [Online] 2016. [Citace: 10. 2 2016.] <http://www.geologicke-mapy.cz/regiony/ku-684368/#dalsi>.

www.chr-hansen.com. 2016. Oenological bacteria. [Online] Chr. Hansen Holding A/S, 2016. [Citace: 20. 2 2016.] <http://www.chr-hansen.com/food-cultures-and-enzymes/wine/our-products/oenological-bacteria?cid=%7bD231E20E-15A4-4EDA-B3CE-30DF0BA7D5F3%7d&pid=%7bE04A090F-FB42-4242-AC76-3523DCF29645%7d>.

www.lalittorale.fr. 2015. Ferments malolactiques. [Online] LA LITTORALE group erbslöh, 2015. [Citace: 10. 2 2016.] <http://www.lalittorale.fr/gamme-produit/c/>.

www.lipera.cz. 2015. *www.lipera.cz*. [Online] 2015. [Citace: 11. 3 2016.] <http://www.lipera.cz/produkty/vyroba-vina/vsechny-pripravky/bakterie-vyziva-lyozym/>.

www.thermofisher.com. 2015. *www.thermofisher.com*. [Online] Thermo Fisher Scientific, 2015. [Citace: 17. 3 2016.] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/90082>.

www.vinarskepotreby.cz. 2012. Produkty. [Online] BS Vinařské potřeby s.r.o. , 2012. [Citace: 20. 9 2015.] <http://www.vinarskepotreby.cz/preparaty/>.

www.wineofczechrepublic.cz. 2015. Odrůdy. [Online] Vinařský fond, 2015. [Citace: 10. 2 2016.] <http://www.wineofczechrepublic.cz/nase-vina/odrudy/odrudy-cervenych-vin/117-zweigeltrebe.html>.