

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



**Stanovení inhibičního účinku resveratrolu na růst bakterií
a kvasinek způsobujících kontaminaci vína, moštu,
a dalších potravin
Diplomová práce**

Autor práce: Bc. Adéla Vernerová

Vedoucí práce: Ing. Pavel Nový, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Stanovení inhibičního účinku resveratrolu na růst bakterií a kvasinek způsobujících kontaminaci vína a moštu " jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8. dubna 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Pavlu Novému Ph. D. za podporu a vedení během přípravy a tvorby této diplomové práce a také Ing. Tereze Žákové za cenné rady a informační zázemí při praktických pokusech.

Stanovení inhibičního účinku resveratrolu na růst bakterií a kvasinek způsobujících kontaminaci vína, moštu, a dalších potravin

Souhrn

Tato vědecká práce je zaměřena na stanovení inhibičního vlivu resveratrolu na kontaminující mikroorganismy. Resveratrol je známý především ve spojení s vínem, proto byla první část práce zaměřena na proces výroby vína a na jeho chemické složení se zaměřením na nejvýznamnější zastoupené látky. Práce seznamuje i s mikroorganismy, které se, především ve víně, ale i v jiných potravinách mohou vyskytovat a podílet se na kažení. Na příkladu vína je vysvětlen proces mikrobiálního kažení a možnosti jeho potlačení. K tomu je v současnosti používán oxid siřičitý, kvůli jeho vedlejším účinkům převládá v poslední době snaha o omezení jeho množství, nebo nahrazení jinou látkou s konzervačními účinky. Jednou z nich je resveratrol, který se již ve víně přirozeně vyskytuje, a jsou známy jeho pozitivní účinky na lidské zdraví. Proto se práce dále zaměřuje na jeho účinnost k potlačení mikrobiální kontaminace. Při pokusech byly použity kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a *Zygosaccharomyces rouxii*, bakterie *Staphylococcus aureus* a *Acetobacter oeni*, jako zástupci kontaminujících mikroorganismů. Bylo bráno v potaz také možné využití nejenom ve vinařství, ale i v jiných oblastech potravinářství. Inhibiční účinek byl stanoven jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) za použití mikrodiluční bujónové metody.

Klíčová slova: antimikrobiální, kontaminace, mošt, resveratrol, víno

Evaluation of growth-inhibitory effect of resveratrol against spoilage microorganisms of wine, must and other food products

Summary

This scientific work is focused on the inhibitory effect of resveratrol on contaminating microorganisms. Resveratrol is known primarily in connection with wine, so that the first part of the thesis focuses on the winemaking process and chemical composition of wine, with a focus on the most important substances represented. This paper introduces the microorganisms that, especially in the vine, beer and other foods can occur and contribute to spoilage. The process of microbial spoilage possibilities and its suppression is explained on the example of the wine. For this is currently used sulfur dioxide, due to its side effects lately prevails the effort to reduce the amount of SO₂ added, or replacement with another substance with preservative effects. One of them is resveratrol, which already occurs naturally in wine and is known for its positive effects on human health. Therefore, the work focuses on resveratrol as well as its effectiveness to suppress microbial contamination. When attempts the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces rouxii*, as well as bacteria *Staphylococcus aureus* and *Acetobacter oeni* were used, as representatives of contaminating microorganisms. Also the possible use in beer, food and other areas has been taken into account. Inhibitory effect was determined as the minimum inhibitory concentration (MIC) using the microdilution broth method.

Keywords: antimicrobial, contamination, must, resveratrol, wine

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Cíl práce a hypotéza	10
3. Rešerše.....	11
3.1. Výroba vína.....	11
3.1.1. Sběr a odslupkování.....	11
3.1.2. Lisování	11
3.1.3. Odkalení.....	12
3.1.4. Fermentace.....	12
3.1.5. Školení vína	13
3.2. Chemické složení vína.....	15
3.2.1. Alkoholy	15
Ethanol	16
Methanol	17
Vyšší alkoholy	17
Glycerol	19
3.2.2. Sacharidy.....	20
Monosacharidy	21
Oligosacharidy	22
Polysacharidy	22
3.2.3. Kyseliny	23
Kyselina vinná	24
Kyselina jablečná	24
Kyselina octová	24
Kyselina mléčná	25
Kyselina máselná	25
3.2.4. Vitaminy	26
3.2.5. Dusíkaté látky.....	27
Amoniakální dusík	27
Aminokyseliny	27
Peptidy	28
Bílkoviny	29
Amidy karboxylových kyselin	29
Biogenní aminy	30

3.2.6. Fenolické sloučeniny	31
Flavonoidy	32
Třísloviny	32
Resveratrol	33
3.3. Mikroorganismy při výrobě vína	33
3.3.1. Kvasinky	34
Saccharomyces	34
Candida	34
Hanseniaspora	35
Pichia	35
Metschnikowia	35
Schizosaccharomyces	36
Zygosaccharomyces	36
Dekkera	36
3.3.2. Bakterie	37
Acetobacter	37
Lactobacillus	37
Pediococcus	37
Oenococcus	38
Bacillus	38
Clostridium	38
3.3.3. Plísně	38
Botritis	38
Penicillium	40
Aspergillus	40
3.4. Kažení vína	41
Vizuální znaky	42
Pachové znaky	42
Chuťové znaky	42
3.5. Možnosti konzervace vína	43
Oxid siřičitý (SO ₂)	43
Lakáza	45
Resveratrol	45
Lysozym	46

Dimethyldikarbonát (DMDC)	46
Kyselina askorbová	46
Kyselina sorbová	47
4. Materiál a Metody	48
4.1. Chemikálie	48
4.2. Mikroorganismy	48
4.3. Kultivace	49
4.4. HPLC analýza	49
4.5. Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC)	50
4.5.1. Makrodiluční bujónová metoda	50
4.5.2. Mikrodiluční bujónová metoda	51
4.6. Příprava inokula kvasinek ve fyziologickém roztoku	52
5. Výsledky	53
5.1. Vývoj modelového (vinného) média	53
5.2. Možnosti zvýšení rozpustnosti resveratrolu	56
5.3. Stanovení MIC vybraných kmenů <i>Staphylococcus aureus</i>	58
6. Diskuse	60
7. Závěr	63
8. Seznam literatury	64
9. Seznam příloh	70
10. Přílohy	71

1. Úvod

Víno, jako jeden z nejstarších alkoholických nápojů, se stalo důležitým doprovodným prvkem jakýchkoli významných událostí lidské kultury. A to nejen té evropské, ale překvapivě i v orientu, ba dokonce v islámských zemích blízkého východu.

Je konzumováno u příležitosti narození, přijetí na studium, dokončení studia, svatby, sportovních, či pracovních úspěchů, přijetí role rodiče i prarodiče a také na pohřbu. Dá se tedy říct, že se s ním setkáváme po celý život.

Podle archeologických výzkumů, víno, jako alkoholický nápoj, vznikl jižně od Kaspického moře v oblasti jižního Kavkazu. Tuto teorii podporuje například íránská legenda stará 3500 let před Kristem (Mendel, 2010). Podle ní byla zkvašená hroznová šťáva původně používána jako jed, neboť člověk po jejím vypití ztrácel soudnost a při předávkování mohl zemřít. Ovšem když perský král Džamšíd objevil i libé pocity plynoucí z konzumace tohoto nápoje, nařídil jeho pití vždy před řešením zásadních státnických záležitostí.

V historii jsou již dlouho známy pozitivní účinky umírněného pití vína. Caesar si byl dobře vědom působení vína proti onemocnění střev. Dával proto svým vojákům pít víno na ochranu proti tyfu, choleře, paratyfu i úplavici. Nutno říci, že s pozitivními výsledky. Byl natolik štědrý, že každý legionář měl nárok na jeden litr vína denně v období míru a dva litry v období války (Burda, 2013). Víno totiž při smíchání s vodou působí jako dezinfekční prostředek vody.

I dnes nacházíme nové a nové výhody z pravidelné konzumace. Je známo, že červené víno podporuje tvorbu červených krvinek. Další je překvapivé zjištění, že víno zbavuje jed kobry a zmije jejich toxických účinků.

Nejnovější poznatky z oblasti výzkumu označují právě resveratrol jako jednu z látek majících pozitivní účinky na lidské zdraví. Bylo prokázáno snížení rizika vzniku několika druhů rakoviny a Alzheimerovy choroby u osob s pravidelnou mírnou konzumací vína. Vzhledem k negativním účinkům oxidu siřičitého, používaného ke konzervaci vína, na lidské zdraví (bolesti hlavy, projevy alergie) i sensorickou kvalitu vína se uvažuje o jeho nahrazení jinými látkami přírodního původu. Resveratrol, jako přirozená součást složení vína je jednou z nich.

2. Cíl práce a hypotéza

Cíle práce: Ověřit inhibiční účinek resveratrolu na růst bakterií a kvasinek kontaminujících víno, vinný mošt a další potraviny. Dílčím cílem je nalézt vhodný způsob rozpouštění resveratrolu ve víně a moštu. Dále pak pomocí vybraných rodů bakterií a kvasinek stanovit jeho antimikrobiální efektivitu.

Hypotéza: Antimikrobiální aktivita resveratrolu in vitro je dobře známá. V případě dostatečně silného antimikrobiálního účinku ve víně a moštu by se mohl resveratrol stát vhodnou náhradou SO₂, neboť na rozdíl od negativních účinků SO₂ vykazuje resveratrol celou řadu pozitivních účinků na lidské zdraví.

3. Rešerše

Víno je alkoholický nápoj vyrobený prokvašením moštu nebo rmutu vinné révy druhu *Vitis vinifera*. (Burda, 2013) Právě z tohoto rostlinného druhu vznikly všechny odrůdy používané ve vinařství. Réva byla už od počátku šlechtěna, aby se přizpůsobila lokálním podmínkám všech oblastí, kde je pěstována. Vzhledem k neustálému objevování nových vhodných lokací, lze tento proces považovat za trvalý.

Například v severní Americe se uplatňují hybridy vzniklé křížením původní evropské révy s tamními druhy *Vitis aestivalis* a *Vitis rupestris*, vyznačují se vyšší odolností vůči škůdcům a nemocem. Ve většině evropských zemí je ale pěstování takovýchto odrůd zakázáno.

3.1. Výroba vína

Proces výroby vín, odborně zvaný vinifikace, spočívá v selektivní extrakci složek hroznů. Neznamená ovšem pouhou realizaci alkoholové fermentace moštu nebo hroznů. Jde o to, a dokonce především, získat z hroznových bobulí jejich nejlepší část. Tedy optimální množství složek určujících kvalitu vína, a zamezit přístupu těm sloučeninám, jež mohou vytvářet chuťové vady nebo vady vůně. (Michlovský, 2014b)

3.1.1. Sběr a odslupkování

Co nejdříve po sběru jsou celé hrozny vsypány do mlecího zařízení. Zde dochází jednak k uvolnění bobulí a zadruhé třapin (stopek). Je žádoucí nepoškodit třapiny ani pecky, protože chlorofyl a třísloviny, v nich obsažené, by přešli do vinného moštu a negativně ovlivnili jeho vlastnosti. V první řadě by se projevil zelenožlutým zbarvením nápoje.

3.1.2. Lisování

Na tento proces existují dva různé směry pohledu. Z kvalitativního hlediska je nutné zachovat co nejvyšší kvalitu získaného moštu, ovšem z ekonomického pohledu je na prvním místě maximální množství. Při dokonalém vylisování můžeme dosáhnout 75 % výlisnosti. (Burda, 2013) Při šetrnějším lisování pro kvalitnější výrobek se upřednostňuje omezit zisk na 60 %.

U červených a bílých aromatických vín¹ se vylisovaný mošt nechává krátce nakvasit po dobu 2 až 4 hodin v procesu takzvané macerace. Dochází tak k uvolnění aromatických

¹ Aromatické bílé odrůdy: Muškát Ottonel, Muškát Moravský, Sauvignon, Tramín červený (Burda, 2013)

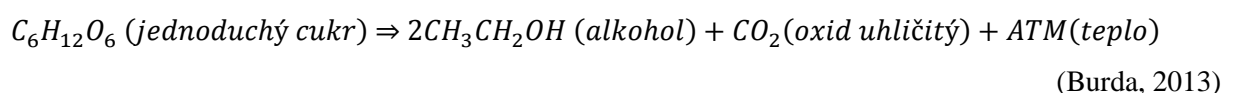
a barevných látek ze slupek. Avšak uvolňuje se i tříslovina tanin s výraznou trpkou a svíravou chutí. To zapříčiňuje trpkost červených vín. Konečná chuť je však ovlivněna i obsahem kyselin, cukrů, alkoholů, hořkých látek a jejich vzájemným poměrem. (Kraus a kol, 2002)

3.1.3. Odkalení

Jelikož je v moštu obsaženo mnoho nežádoucích příměsí v podobě zbytků slupek, kousků dužiny, prachu a kalných látek, je nutno ho před dalším zpracováním vyčistit. Tento proces je obzvláště důležitý při výrobě bílých vín, neboť je nežádoucí, aby barviva vyluhovaná ze slupek ovlivnila barvu výsledného produktu. K účelu odkalení se tedy využívají sedimentační tanky. Zde dochází k samovolné sedimentaci pevných částic a také divokých kvasinek, které jsou rovněž nežádoucí. Z důvodu urychlení tohoto procesu se přidávají krystalizační centra, jako například moštová želatina či bentonit. K následné úpravě se využívá pouze čirý odkalený mošt. Alexandr Burda (2013) uvádí výtěžnost 60 litrů čistého moštu z 1000 kg hroznů.

3.1.4. Fermentace

Za anaerobních podmínek dochází v moštu k procesu zvanému anaerobní glykolýza neboli fermentace. Pomocí kvasinek se jednoduché cukry přeměňují na ethanol (alkohol) a oxid uhličitý, který uniká do atmosféry. Rovněž zde vzniká teplo. Proces lze vyjádřit chemickou rovnicí.

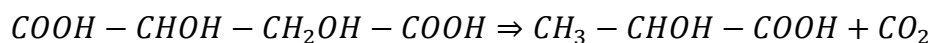


Používají se nejčastěji čisté vyšlechtěné kultury vinařských kvasinek rodu *Saccharomyces cerevisiae*. Trendem je jejich šlechtění pro tvorbu a odolnosti vyššímu množství alkoholu, díky kterému je víno více stabilní.

Lze využít také přirozenou mikroflóru na povrchu hroznu neboť i ta obsahuje divoké kvasinky. Tato metoda je upřednostňována v biodynamickém vinařství. Nevýhoda ovšem je výrazné zvyšování teploty. Z technologického pohledu je žádoucí provádět fermentaci při nižší teplotě po delší dobu. Čím déle totiž proces probíhá, tím více aromatických látek při něm vzniká, což je důležité z hlediska tvorby plného buketu. Pro bílá vína se doporučuje udržovat rozmezí mezi 6,5 a 8 °C. (Seldon, 1996) Pokud dosáhne teplota 22 °C a více, probíhá fermentace příliš rychle, do vína přejde méně aromatických látek a jeho buket je nevýrazný. Při vysokých teplotách také dochází k výraznému odpařování vína.

Z tohoto důvodu je nutno provádět řízenou fermentaci a plášť tanku ochlazovat. Navíc kvůli zvýšenému riziku kontaminace nelze zaručit optimální průběh procesu. Do hry vstupují i jiné metabolické procesy, kromě kvašení.

Při výrobě červeného vína a zejména za špatných klimatických podmínek dochází k nadměrné tvorbě kyselin v hroznech. Zvláště pak ostré a nestabilní kyseliny jablečné. Lze ji, pomocí bakterií mléčného kvašení, přeměnit na kyselinu mléčnou a oxid uhličitý.



(Michlovský, 2014b)

Mluvíme o takzvané jablečno-mléčné fermentaci. Vzniklá kyselina mléčná není tak ostrá a můžeme ji odstranit v době zrání vína. (Kraus a kol, 2002) Během této přeměny dochází pouze k mírnému snížení acidity vína. Vedle toho vznikají i jiné vedlejší produkty, proto je tento proces žádoucí především při výrobě červených vín, kde pomáhá zmírnit kyselou chuť a dodává další chuťové nuance a vláčnost. U bílých odrůd většinou není druhotná jablečno-mléčná fermentace na místě, neboť u nich snižuje pocit křehké svěžesti. Jedinou výjimkou v tomto ohledu je Chardonnay. Při jehož druhotné fermentaci vzniká diacetyl, známý jako hlavní chuťová složka v másle, která dodává vínu máslovou komplexnost, jenž je zde vítána. (Seldon, 1996)

3.1.5. Školení vína

Velmi důležitá fáze při výrobě vína. Tvoří ji soubor opatření s cílem maximálně zvýšit kvalitu budoucího vína. Probíhá v nerezových tancích nebo dubových sudech, ve kterých dochází k pomalému dokvácení a přeměně látek. Výsledné víno pak dosahuje určitého stupně zralosti. Díky tomu je prodloužena jeho chemická i biologická stabilita a je možno jej lahvovat a uchovávat.

V úvodu dochází k síření vína, používá se především u bílých vín. Hlavní důvod spočívá v ochraně před znehodnocením mikroorganismy a případnou oxidací. Používá se ještě před lahvováním, aby se zvýšila stabilita. Množství použitého oxidu siřičitého odpovídá kvalitě hroznů a čistotě prostředí, ve kterém byly sklizeny a zpracovány. Vína v maloobchodním prodeji mají zpravidla vyšší míru zasíření, než kvalitní ročníky určené pro luxusnější vinotéky.

Následně se provádí číření vína. V tomto procesu je nutno odstranit látky tvořící zakalení, neboť způsobují nestabilitu nápoje. Může docházet až ke druhotné fermentaci. Nejčastěji se používá bentonit, v podstatě jde o jemně rozemletou horninu, která pozvolna

propadává tekutinou a strhává s sebou kalící částice. V minulosti se hojně užíval vaječný bílek, dnes se s ním však setkáme jen výjimečně. Výhodou je, že některé vady lze tímto procesem odstranit opětovně.

Usazené látky a mikroorganismy se odstraňují v následné filtraci. Víno se zbavuje také uhynulých kvasinek tvořících takzvaný kvasničný kal. Výrazně se tím zvýší stabilita vína. Filtrované víno je schopné vydržet i několik let bez nežádoucích změn kvality. Vína vyráběná metodou *Sur lie* (tzv. na kvasnicích) se před lahvováním nefiltrují. To umožňuje pokračování procesu fermentace v lahvi. (Burda, 2013)

Následuje období klidu, nazývané zrání vína. Zde dochází k takzvané terciální aromatizaci (míněno, že primární probíhá v hroznech a sekundární v průběhu kvašení). Reakcí kyselin s alkoholem vznikají estery podílející se na tvorbě terciálního buketu. Rychlost procesu je velmi rozdílná, u bílých vín probíhá rychleji, červeným vínům se doporučuje zrát minimálně jeden rok. (Burda, 2013) V posledních desetiletích se preferuje k tomuto účelu používat dubové sudy. Speciální typ *barrique* má pozitivní vliv na chuť i vůni v něm uloženého vína, je rozšířen hlavně k výrobě červených vín. Při tomto způsobu má na výsledný produkt vliv druh dřeva, jeho pórovitost, biochemické složení příbuzné vínu (dané především obsahem ligninu, taninu a celulózy) i tepelně izolační vlastnosti. Správně vyrobený dřevěný sud napomáhá stabilizaci vína, upevňuje jeho strukturu a výrazně ovlivňuje jeho aromatu. (Burda, 2013) Během ležení v sudech, které může trvat i několik let, je nutno víno čas od času scezovat a přepouštět do dalších sudů. Při této příležitosti se rovněž provzdušňuje. Tato aktivita je prospěšná pro odstranění nepříjemných vedlejších produktů vznikajících při dlouhodobém pobytu v sudu, jako například odporně páchnoucí sírník. (Seldon, 1996)

3.2. Chemické složení vína

Hlavní produkt pěstování, tedy víno, vzniká prokvašením vylisované hroznové šťávy. Samotný hrozen se skládá z třapiny a bobulí. Třapina, kromě 35 – 90 % vody, obsahuje cukry, kyselinu vinnou a jablečnou, třísloviny a rostlinná barviva, z nichž nejvýznamnější podíl představuje chlorofyl. Pokud jsou třapiny nevyzrálé, lze je snadno rozdrtit, což má za následek vyluhování nežádoucím tříslovin a chlorofylu do moštu, které nepříznivě ovlivňují sensorické vlastnosti budoucího vína.

Na celkovém aroma a charakteru se významně podílí slupky bobulí, nazývané matolina. Jejich základní složení sestává z cukrů, tříslovin, kyselin, barviv, vosků a množství aromatických, dusíkatých a minerálních látek. Slupky bílých odrůd jsou mimoto bohaté na flavonová barviva a chlorofyl. Červené a modré koncentrují spíše anthokyany, jejich další významnou složkou jsou třísloviny dotvářející chuť vína.

Dužina je z výrobního pohledu nejdůležitější část, tvoří totiž průměrně 85 až 90 % hmotnosti bobule. Oplývá množstvím cukrů, hlavně glukosy a fruktosy, a také významným podílem kyseliny jablečné a vinné, dusíkatých a minerálních látek, stejně jako enzymů a vitaminů. Její konzistence je závislá na obsahu pektinů, které jsou nežádoucí, neboť jejich fermentace během zpracování zvyšuje obsah methanolu.

Poslední důležitou složkou jsou semena. V jedné bobuli může být jedna až čtyři. Jsou významným zdrojem tříslovin a také olejů, jež se uplatňují v gastronomii při přípravě salátů. Pouze některé stolní odrůdy byly vyšlechtěny, jako bezsemenné. (Burda, 2013)

3.2.1. Alkoholy

Hned po vodě jsou alkoholy druhou nejvýznamnější složkou vína. Dosud bylo identifikováno přes třicet různých alkoholů. Většina z nich se však vyskytuje v malém nebo stopovém množství. Alkoholy s více než dvěma atomy uhlíky se nazývají vyšší alkoholy a společně s organickými kyselinami, jejich estery a dalšími látkami vznikajícími v průběhu kvašení tvoří přiboudlinu. Nejčastěji jsou ve víně přítomné pouze ve stopovém množství a spolu s estery hrají významnou úlohu v buketu vína. (Michlovský, 2014a) Nejvýznamnější alkoholy s jejich průměrným obsahem jsou uvedeny v příloze 1.

Ethanol

Největší obsah má ethanol. Je to produkt fermentace cukrů kvasinkami. Jeho množství vznikající při výrobě vína je přímo závislé na stavu zralosti hroznů a na druhu v procesu působících kvasinek. Ve vinařské praxi můžeme počítat s rodem *Saccharomyces*, jenž je i díky dlouholetému šlechtění jeho největším producentem. S přílišnou konzumací alkoholických nápojů je spojeno mnoho negativních vlivů na zdraví - zvýšené riziko vzniku rakoviny (rakovina jícnu 18x vyšší pravděpodobnost, obecně riziko onemocnění 40x vyšší než u abstinenta), zánět slinivky břišní, cirhóza jater, steatóza (zbytnění) jater, zánět či karcinom jater.

O něco méně se ale ví i o jeho pozitivních účincích: alkohol ve víně snižuje shlukování krevních destiček a společně se snižováním krevního tlaku působí proti ucpávání tepen, při pravidelné konzumaci vína se snižuje nebezpečí vzniku srdečního infarktu. Dále příznivě podporuje trávicí činnost díky obsahu kyselin, víno konzumované s jídlem také příznivě ovlivňuje poměr mezi zásadotvornými a kyselinotvornými procesy při trávení. Alkohol usnadňuje trávení látek nerozpustných ve vodě, zejména tuků. (Burda, 2013)

Seldon (1996) také upozorňuje že „podle francouzského Národního institutu pro zdraví a lékařský výzkum snižuje umírněná konzumace alkoholu riziko koronárních srdečních chorob až o 50 %.“

Kulturní kvasinky jsou schopny vytvořit nejvíce 15 až 16 % alkoholu, poté i ony umírají. U většiny stolních vín se fermentace zastavuje při 11 až 14 %² alkoholu. (Seldon, 1996) V zemích evropské unie je povolen přídavek ethanolu do likérového, alkoholizovaného, perlivého a šumivého vína. Opačný proces, dealkolizace, je povolen u všech druhů, pokud předtím nebyla u moštu zvyšována cukernatost. Snížení celkového obsahu alkoholu však nesmí přesahovat 2 % obj. (Michlovský, 2014a)

Během vyzrávání v dřevěných sudech i při různých druzích manipulace s vínem může stupeň ethanolu ve víně klesat odparem až o 0,2 %. Nastává zde totiž proces prodýchávání ethanolu křísovými kvasinkami, jenž vytváří podmínky pro oxidaci ethanolu na acetaldehyd a dále na kyselinu octovou pomocí bakterií octového kvašení. (Michlovský, 2014a)

² 9 až 13 % obj. odpovídající 70 až 100 g/l (Michlovský, 2014a)

Methanol

Přítomnost methanolu ve víně je spojena s hydrolýzou pektinů způsobenou enzymy hroznů během fermentace. Při samotném alkoholovém kvašení methanol nevzniká. Jeho podíl v hotovém víně je přímo závislý na délce macerace pevných částí hroznu, zvláště pak slupek. Tím je vysvětlen nižší podíl methanolu v bílých vínech na hodnotě 17 až 100 mg/l. Zatímco u červených vín se pohybuje v rozmezí od 60 do 230 mg/l. (Steidl, 2010)

Při ohřevu rmutu během termovinifikace dochází k destrukci přírodních proteolytických enzymů, které při klasické vinifikaci zajišťují hydrolýzu pektinů. Jak vysvětluje Michlovský (2014a): „Pektiny jsou heteropolysacharidy tvořené hlavně řetězci methanolem esterifikovaných galakturonových kyselin.“ To odůvodňuje skutečnost, že vína z kontinuální vinifikace mají průměrně menší obsah methanolu, nežli vína získávaná klasickou vinifikací. V průběhu karbonické macerace (pod atmosférou CO₂) nastává opačný proces. Tedy kontinuální vinifikací získáme ve víně vyšší obsah methanolu, než při použití klasické vinifikace.

Rovněž odrůda má na složení rmutu a následně i vína vliv. Některé hybridní odrůdy mohou za stejných podmínek vinifikace produkovat dvojnásobný podíl methanolu v hotovém víně ve srovnání s *Vitis vitifera*. Maximální povolený obsah methanolu v Evropské unii je 10 gramů na litr ethanolu. Mezinárodní vinařská organizace (OIV - International Organisation of Vine and Wine) doporučuje maximální limit u červených vín 300 mg/l vína a u bílých vín 150 mg/l vína. Při obsahu více než 500 mg methanolu na litr vína jsou již tato vína považována za toxická. Jejich konzumace ve vyšších dávkách může způsobit slepotu a dokonce smrt. (Michlovský, 2014a)

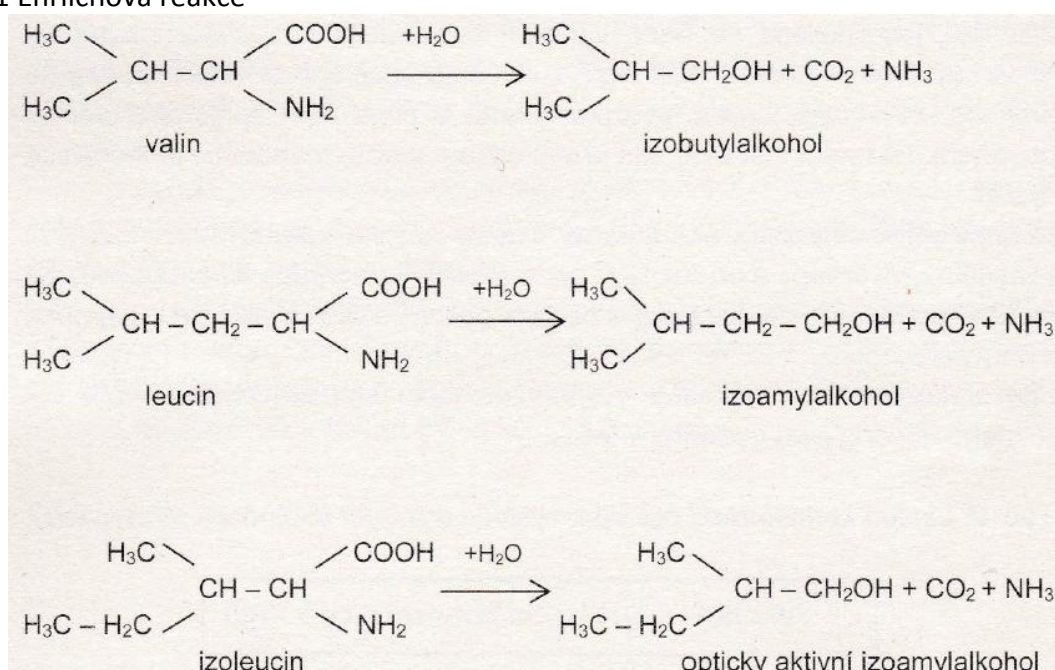
Vyšší alkoholy

Nasycené vyšší alkoholy jsou přítomny pouze v malém množství. Jejich soubor tvoří malý hmotnostní podíl v rozmezí 200 až 600 ml/l. (Michlovský, 2014a) Jejich úloha při utváření aroma vína je však značná. Jejich nadměrný obsah přesahující celkově 400 mg/l není z hlediska sensorických vlastností vítán, i když některá vína s nízkým množstvím vyšších alkoholů (zejména izoamylalkoholů) dosahují mezi degustátory kladného hodnocení. Mezi autory však převládá názor, že „kvalita vína z hlediska buketu a chuti není spojená s určitým obsahem některé substance, ale je výsledkem složité rovnováhy jednotlivých složek“. (Michlovský, 2014a)

Nejdůležitějšími alkoholy mezi tří až pětiuhlíkatými jsou izopropylalkohol, 2-methylpropanol a 2-methylbutanol. V červených vínech byly také zjištěny acyklické alkoholy fenylmethanol a fenylethanol v koncentracích až několik stovek miligramů.

Tvorba vyšších alkoholů je spojena s metabolismem kvasinek ale také s charakterem a množstvím dusíkatých látek majících vliv na jejich výživu. Můžeme si ji vysvětlit pomocí Ehrlichovy reakce, soubor dekarboxylací a následných deaminací. Přechodným produktem vznikajícím při tomto procesu jsou ketokyseliny. Lze tak vysvětlit vznik jak již výše zmíněného 2-methylpropanolu a 2-methylbutanolu, taktéž i izoamylalkoholu nebo aktivního amylalkoholu.

Obr. 1 Ehrlichova reakce



Zdroj: (Michlovský, 2014a)

Reakce se uskutečňuje pouze v případě, kdy je kvasinka nucena použít aminokyseliny jako zdroj dusíku. Pokud se v moštu vyskytuje ve vyšší míře jiný zdroj, například amoniakální dusík, je při následné fermentaci pozorován vznik nižšího množství vyšších alkoholů. Přidáním kyslíku na začátku kvašení docílíme stimulace produkce vyšších alkoholů a většiny esterů. Poměr esterů ku vyšším alkoholům za přítomnosti kyslíku klesá, což má nepříznivý účinek na sensorickou kvalitu vína. Metabolismus výživy a použitý kmen kvasinek má tedy další signifikantní vliv na podíl tvorby vyšších alkoholů.

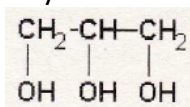
Ve vzácných případech se můžeme setkat s přítomností thioalkoholu, známého pod názvem merkaptan. Tato organická sloučenina síry vzniká reakcí sirovodíku, jako přirozeného vedlejšího produktu fermentace, s alkoholem. Velmi nepříjemně zapáchá

a je známkou nedbalé přípravy vína, neboť sirovodík je za normálních okolností odstraněn v průběhu čiření. (Seldon, 1996)

Glycerol

Jedná se o nejjednodušší cukerný alkohol. Je hojně používán ve farmaceutickém průmyslu. Jeho tři hydroxylové skupiny jsou odpovědné za jeho rozpustnost a hygroskopickou povahu. Vyznačuje se sladkou chutí a nízkou toxicitou, díky těmto vlastnostem je ve víně vítán.

Obr. 2 Glycerol



Zdroj: (Michlovský, 2014a)

Je třetí nejhojnější složkou vína hned po vodě a ethanolu. Jeho průměrný obsah se pohybuje na hodnotách od 6 do 10 g/l. Ačkoli má sladkou chuť, ze sensorického hlediska přispívá spíše k jemnosti a plnosti vína. Práh vnímání u člověka leží na 5,2 g/l. Ideální obsah glycerolu ve víně se udává kolem 6,7 g/l při 12 % obj. alkoholu. Jeho tvorba závisí na počátečním množství cukrů, charakteru kvasinek a podmínkách kvašení, lze ji zvýšit například nižším zasyřením. Obsah glycerolu v samotném moštu je určen zdravotním stavem sklizených hroznů. Ušlechtilá plíseň *Botritis cinerea* produkuje glycerol na úkor glukózy a tudíž obsah glycerolu v moštu z takto napadených bobulí může přesahovat hodnotu 20 g/l.

V poškozených bobulích, napadených plísní *Botritis cinerea*, dochází také k tvorbě dalších vyšších alkoholů působících aromatické vady. Při analýze pomocí plynové chromatografie spojené s olfaktometrií byly zjištěny následující produkty:

oktenon (1-okten-3-non)

Pochází z oxidačního rozkladu nenasycených mastných kyselin. Je rovněž i metabolit mnoha druhů hub, proto bývá často detekován na hroznech postižených různými formami hniloby. Vyznačuje se intenzivním pachem po houbách. Jeho koncentrace v některých vínech dosahuje až 400 ng/l, což je vyšší, než práh čichového vnímání této sloučeniny³. V průběhu alkoholového kvašení může dojít k výraznému poklesu jeho obsahu.

³ 3 ng/l ve vodě, nebo 30 ng/l v modelovém roztoku (Michlovský, 2014b)

nonenon (1-nonen-3-on)

Zpravidla nebývá detekován v poškozených hroznech nebo moštu vyrobeném z nich. Jeho přítomnost je zjišťována až ve vínech po alkoholovém kvašení. Je sloučeninou mimořádně vonící, do vína přináší intenzivní houbový pach. Jeho koncentrace je variabilní, objevuje se v množství od 8 do 130 ng/l (přičemž práh čichového vnímání člověka byl u 50 % degustátorů stanoven na 1 ng/l ve vodě a 8 ng/l v modelovém roztoku). (Michlovský, 2014b)

Mezi podobné látky, jenž mohou znečistit aromatický výraz vína se řadí:

Geosmin – vyskytuje se v malých koncentracích a může se tudíž vyloučit, někdy ovšem přesto postihuje aroma

2-methylizoborneol – netvoří trvalou součást vína, dochází k jeho odbourávání během fermentačního procesu

2-metyoxy-3-izopropylpyrazin – většinou je fungického původu, ačkoli u odrůdy Sauvignon blanc se vyskytuje přirozeně

Tyto tři látky dosahují zpravidla méně než polovičního množství, než je člověk schopen svými smysly zachytit, nejsou tedy příliš nebezpečné pro celkový požitek z vína.

Další produkty rozkladu nenasyčených mastných kyselin vyskytujících se zvláště při sklizni poznačené révvím padlím jsou 1,5-oktadien-3-on a 4-hepten-1-ol vyznačující se bylinnými tóny vůně. (Michlovský, 2014b)

3.2.2. Sacharidy

Jedná se o organické molekuly patřící mezi polyhydroxyderiváty karbonylových sloučenin. Podle funkční skupiny je dělíme na aldózy (aldehydická skupina), nebo ketózy (ketonická skupina). Další způsob dělení je dle počtu jednotek ve struktuře:

Monosacharidy

Jednoduché cukry obsahující pouze jeden monosacharid. Dobře se rozpouští ve vodě. Jsou základní stavební jednotkou všech složitějších cukrů a nesou sladkou chuť.

Oligosacharidy

Molekuly složené ze dvou až deseti monosacharidových jednotek. Jejich vlastnosti jsou podobné monosacharidům a mají rovněž sladkou chuť.

Polysacharidy

Dlouhé uhlovodíkové molekuly složené z více než deseti monosacharidových jednotek spojených glykosidickými vazbami. Tvoří je buď řetězec jednoho monosacharidu

(homopolysacharidy), nebo více různých monosacharidů (heteropolysacharidy). Nenesou již sladkou chuť. V průběhu ležení vína jejich obsah celkově klesá.

Monosacharidy

Dle počtu uhlíků ve struktuře se dají dělit na:

Triózy ($C_3H_6O_3$) – např. Glyceraldehyd, jež se vyskytuje ve stopovém množství jako meziprodukt metabolismu sacharidů kvasinek. Dihydroxyaceton se ve zdravých hroznech nevyskytuje, jeho přítomnost může být způsobena bakteriemi octového kvašení, které v aerobním prostředí oxidují glycerol na dihydroxyaceton.

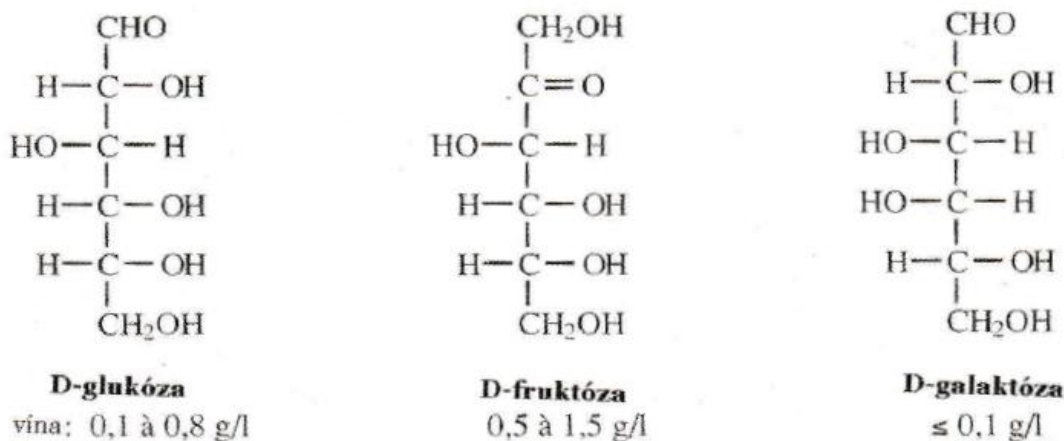
Tetrózy ($C_4H_8O_4$) – jejich přítomnost ve víně nebyla zjištěna

Pentózy ($C_5H_{10}O_5$) – vyskytují se v nezanedbatelném množství, protože nejsou zkvašovány kvasinkami rodu *Saccharomyces*. Například L-arabinóza s obsahem 0,2 – 1,5 g/l; D-ribóza v rozmezí 0,0 – 0,4 g/l; L-rhamnóza ve víně 0,1 g/l.

Hexózy ($C_6H_{12}O_6$) – obecně jsou nejdůležitější skupinou monosacharidů ovlivňující chuť potravin.

Heptózy ($C_7H_{14}O_7$) a Októzy ($C_8H_{16}O_8$) – byly ve vínech zjištěny ve velmi malém množství.

Obr. 3 Nejdůležitější hexózy



Zdroj: (Michlovský, 2014a)

Vinné hrozny ukládají málo sacharózy, spíše se akumulují hexózy. Zejména dužina bobulí obsahuje glukózu a fruktózu. Druhá jmenovaná odstraňuje únavu a příznivě působí při srdečních chorobách nebo onemocnění jater, tím přispívá k celkovému posílení organismu.

Konzumace hroznů také mírně zdvihá hladinu cukru v krvi, čímž může působit jako prevence cukrovky neboť ochraňuje slinivku břišní tvořící inzulin. (Burda, 2013)

Glukóza a fruktóza se v moštu vyskytují v poměru 0,95 : 1,00. Během jablečno-mléčné fermentace jsou obě spotřebovávány heterofermentativními bakteriemi rodu *Lactobacillus*. Glukóza je hlavním produktem fotosyntézy a je spotřebovávána při buněčném dýchání. Rovněž kvasinky rodu *Saccharomyces* preferují při fermentaci D-glukózu, proto její obsah rychle klesá. Fruktózu a galaktózu metabolizují bakterie, které se v moštu připraveném ze zdravých hroznů téměř nevyskytují, proto je konečný obsah těchto monosacharidů téměř ekvivalentní počátečnímu. Všeobecně lze říci, že hotové víno neobsahuje více než 0,5 g/l zbytkové glukózy s poměrem 0,1 – 0,5 ku fruktóze. (Michlovský, 2014a)

Oligosacharidy

Ve víně bývají jen ve stopovém množství, snadno se hydrolyzují na monosacharidové jednotky, jež je tvoří.

Laktóza – mléčný cukr složený z D-galaktózy a D-glukózy spojených β 1→4 glykosidickou vazbou, může být hydrolyzován bakteriemi mléčného kvašení. Ve víně se běžně nevyskytuje, obsahuje ho však produkt na bázi kaseinu používaný k číření vína.

Maltóza – sladový cukr tvořený dvěma molekulami D-glukózy spojenými α 1→4 glykosidickou vazbou. Ve vínech je obsažen ve stopovém množství. Vyšší obsah indikuje podvodné přidávání sladidla za účelem zlepšení sensorického hodnocení.

Trehalóza – je tvořena dvěma molekulami D-glukózy spojenými α 1→1 glykosidickou vazbou, pravděpodobně ji obsahují mošty botritizovaných hroznů. Je také vylučována kvasinkami během alkoholové fermentace a při autolýze, v takových případech její obsah stoupá až na 600 mg/l. Je také asimilována některými bakteriemi.

Sacharóza – skládá se z D-glukózy a D-fruktózy, je snadno hydrolyzovatelná. Rostlinné buňky ji obsahují ve velkém množství jako transportní sacharid, v moštech se s ní setkáme v malém množství 2 – 5 g/l. Ve finálním víně by se vyskytovat neměla, její obsah svědčí o falšování.

Polysacharidy

Jejich celkový obsah ve víně je 2 – 4 g/l. Tvoří podstatnou část koloidních látek, které jsou nežádoucí při filtraci. Obsah závisí na odrůdě hroznů a jejich vyzrálosti a zdravotním stavu (obzvláště plíseň šedá *Botritis cinerea*), typu a způsobu vinifikace a klesá s dobou uchovávání vína.

Pektiny – v hroznech představují rezervní látky, pektolytickou činností *Botritis cinerea* se jejich obsah zvyšuje na 500 mg/l. Čistý pektin je tvořen lineárním řetězcem methanolem

esterifikovaných polygalakturonových jader. Množství pektinu a methanolu kolísá dle odrůdy, zralosti a způsobu vinifikace. V mladých vínech je obsaženo až 500 mg/l, toto množství rychle klesá, neboť dochází k hydrolyze, při které vznikají galakturonové kyseliny, methanol, arabinóza, galaktóza, ramnóza a xylóza.

β -glukan – tento polysacharid vylučuje *Botritis cinerea* a v napadených hroznech dosahuje množství 300 mg/l. V malém množství (pod 50 mg/l) má pozitivní vlastnosti: jako ochranný koloid zabraňuje slučování volných částic a tím i číření vín, vytváří mastný nános, který se usazuje na filtrech a ucpává je, čímž snižuje účinnost filtrace.

Enzymem β -glukanáza se hydrolyzuje na glukózu. Přídavek z houby *Trichoderma harzanium* obsahující tento enzym je povoleno přidávat pro číření moštů a vín.

Kvasinky během růstu a při alkoholové fermentaci, obzvláště ovšem při autolýze uvolňují mannoproteiny ze svých buněčných stěn. Tvoří je cca. 10 % D-mannóza, 10 – 20 % bílkoviny a 10 % D-glukóza. V závislosti na použitém kmeni kvasinek se během fermentace vyskytují v koncentraci 100 – 150 mg/l. Pro svou úlohu inhibitorů bílkovinných zákalů a vypadávání vinného kamene hrají důležitou roli ve stabilitě vín. Rovněž se uvolňují při ležení na kvasnicích a mají tak roli z organoleptického hlediska. Bakterie mléčného kvašení jsou schopné je využívat jako zdroj dusíku.

Bakterie mléčného kvašení mohou z jednoduché cukry přeměňovat na polysacharidy. *Leuconostoc mesenteroides* vytváří z glukózy dextran, v přírodní bakterioflóře hroznového moštu dosahuje koncentrace 10^4 – 10^5 JTK⁴/ml. Ve víně se vyskytuje velmi vzácně. Mimo enologii se přidává k doplňkům výživy díky své organoleptické i chemické neutralitě.

Při slizovatění vína, způsobeném infekcí *Pediococcus damnosus* je bakterií produkován glukomannan (hydrolyzou lze získat glukózu a mannózu), glukan a jiné heteropolysacharidy. (Michlovský, 2014a)

3.2.3. Kyseliny

Acidita moštu (podíl veškerých kyselin) je dána z 90 – 95 % kyselinou vinnou a jablečnou. Ty jsou přítomné ve všech orgánech. Během přípravy vína se složení kyselin značně mění. V hotovém víně je jejich podíl nižší z důvodu vysrážení vinného kamene a případně jablečno-mléčné fermentaci. Organické kyseliny mohou pocházet ze zdravých nebo poškozených hroznů, nebo vznikají až v průběhu fermentace jako produkt metabolismu kvasinek či bakterií. (Michlovský, 2014a)

⁴ JTK – jednotka tvořící kolonii, z mikrobiologického hlediska nerozlišujeme, zda kolonie vznikla z jedné buňky nebo z více ležících v těsné blízkosti

Kyselina vinná

Kyselina vinná se vyskytuje v bobulích běžně pěstovaných odrůd, její koncentrace se pohybuje v závislosti na odrůdě v hodnotách od 6 do 11 g/l. V přírodě se kromě vinné révy prakticky nevyskytuje. Je známá svou kovovou příchutí a agresivitou. Akumuluje se v době přibližně čtyřiceti až padesáti dnů po odkvětu. Vzniká jako vedlejší produkt metabolismu cukrů. Její množství zůstává po celou dobu vyzrávání poměrně konstantní. Pokud teplota nepřesáhne 30 °C, již se nijak nepřetváří. (Michlovský, 2014b) Může být vysrážena v podobě vinného kamene. Odolává působení většiny bakterií, některé druhy rodu *Lactobacillus* ji však mohou rozkládat v procesu tzv. „vínano-mléčné fermentace“, známé jako zvrhnutí vína. (Michlovský, 2014a)

Kyselina jablečná

Naopak velmi aktivním produktem metabolismu bobule je kyselina jablečná. Podléhá například katabolickým reakcím v pozdějších fázích vývoje. Její obsah ve víně se pohybuje v hodnotách 2,6 až 8,5 g/l, u některých odrůd ve vyšším stupni zralosti klesá na úroveň 1,5 g/l. Zastíněné listy vinné révy produkují především kyselinu jablečnou. Během vyzrávání sehrává roli energetického vektoru, je také zdrojem uhlíku pro metabolismus bobule. Během zaměkání bobulí může její obsah klesat nebo setrávat na stejných hodnotách v závislosti na odrůdě vinné révy. (Michlovský, 2014b)

Kyselina octová

Nejběžnější je kyselina octová tvořená bakteriemi rodu *Acetobacter*. V malém množství doladuje komplexní aroma vína. Je důležité, aby celý proces fermentace probíhal v anaerobním prostředí bez přístupu kyslíku, jinak dochází k octovému kvašení projevujícím se slabým povlakem na hladině nazývaným „octová matka“. Rizikovým faktorem je i nízký obsah alkoholu nebo nezkašené zbytky cukru. Náchylnější jsou mladá vína. Bakterie se rychle rozmnožují při teplotě 28 až 30 °C. Již vzniklá kyselina octová se nedá odstranit uhličitánem vápenatým. Bílé víno s obsahem kyseliny octové 1,2 g/l a červené s obsahem 1,4 g/l už nesmí být předmětem obchodu. Jedinou možností využití takto napadených vín je výroba destilátů. Vhodným nástrojem na potlačení růstu octových bakterií je kyselina siřičitá. K zabránění jejich činnosti stačí 50 mg/l volné kyseliny siřičité. (Pátek, 1998) Tyto bakterie produkují rovněž octan ethylnatý, jehož zápach se dá přirovnat k odlakovači na nehty.

Kyselina mléčná

Další běžnou složkou vína je kyselina mléčná tvořená rodem *Lactobacillus*. Spolu s dalšími vedlejšími produkty je rovněž vítána pro doladění chuti. (Seldon, 1996)

Dalšími bakteriemi mléčného kvašení mohou být *Bacterium gracile* a *Bacterium mannitopoeum*. Jsou již nežádoucí, jelikož jejich drsná chuť a vůně připomíná kvašené zelí. Vyskytují se především ve vínech s nízkým obsahem veškerých kyselin a tříslovin. Další faktory napomáhající jejich rozvoji je vyšší teplota (optimálně 24 až 30 °C) a zbytek neprokvašeného cukru, především u mladého vína. Bakterie jsou anaerobní a částečně odolné vůči oxidu siřičitému. Jejich činnost ovšem zastavuje vysoký obsah alkoholu (14 %) a další překážky v podobě nízké teploty při kvašení a vyššího obsahu kyselin. Současně s mléčným kvašením probíhá i kvašení manitové. Vzniklý manit dodává vínu nasládlou chuť. (Pátek, 1998)

Kyselina máselná

Máselné kvašení se může vyskytnout jako pokračování mléčného a opět probíhá u vín s nízkým obsahem kyselin. Vznikající kyselina máselná má velmi nepříjemnou chuť připomínající zkaženou siláž. Dochází zde i k rozkladu glycerinu, jenž následně štěpí alkohol na butylalkohol. (Pátek, 1998)

Při napadení mikroorganismy (plíseň šedá, kyselá plíseň) se kyseliny metabolizují a vznikají tak další látky jakožto produkty metabolismu plísní. Při kyselé hnilobě se vytváří velké množství stálých kyselin, jako například kyselina glukonová, slizová, oxo-glukonová, octová a ethylacetát. U zdravých hroznů nepřesahuje množství kyseliny glukonové v moštu jednotky miligramů na litr, avšak poškozené a nahnilé hrozny dávají mošt s koncentrací 5 až 15 g/l. Vzniklá kyselina glukonová se již dále nemetabolizuje a slouží tady jako skvělý marker přítomnosti šedé plísně (*Botritis cinerea*) v moštech a ve vínech. (Michlovský, 2014b)

Mošty vyrobené z nahnilých hroznů mají silnější schopnost vázat oxid siřičitý a tím ho inaktivovat, nežli ty vyrobené ze zdravých hroznů. Ketonové kyseliny (pyrohroznová, oxo-glutarová) s obsahem několika miligramů na litr ve zdravém moštu mohou vzrůst až na hodnoty přecházející na 50 až 200 mg/l. u moštu vyrobeného z nahnilých hroznů to představuje mnoho desítek miligramů vázaného oxidu siřičitého v jednom litru. (Michlovský, 2014b)

3.2.4. Vitaminy

Tyto organické nízkomolekulární látky jsou syntetizovány téměř výhradně autotrofními organismy. V určitém minimálním množství jsou potřebné k látkové přeměně a regulaci metabolismu člověka. Často fungují jako katalyzátory biochemických reakcí.

Dělí se z hlediska rozpustnosti:

- v tucích (lipofilní) – vitaminy A, D, E, K. Ve víně se nevyskytují.
- ve vodě (hydrofilní) – vitaminy skupiny B a vitamin C

Nadměrná konzumace vína způsobuje deficit vitaminů, to je dáno souhrou dvou jevů. Jednak nedostatečným přísunem potravin s výrazně vyšším obsahem vitaminů než víno. Za druhé sníženou schopností trávicí resorpce vyvolanou chronickým alkoholismem (zvláště patrný deficit vitaminů skupiny B). (Michlovský, 2014a) Obecně je vyšší obsah vitaminů v červených vínech, nežli v bílých.

Víno obsahuje téměř všechny vitaminy skupiny B, kromě B12 živočišného původu (přítomen pouze ve stopovém množství). B vitaminy působí příznivě na látkovou přeměnu na buněčné úrovni a pozitivně ovlivňují činnost nervů a kvalitu kůže. (Burda, 2013)

Jejich doporučené denní dávky jsou uvedeny v příloze 5, průměrný obsah je následující:

Thiamin – v moštu až 500 µg/l, do vína přechází 60 µg/l. Růstový faktor kvasinek. Do hotového vína se přidává ve formě hydrochloridus maximální povolenou dávkou 0,6 mg/l přepočteno na thiamin. (Nařízení ES č. 606/2009)

Riboflavin – 10 – 100 µg/l v bílých vínech, u červených je citelně nižší v důsledku spotřeby při jablečno-mléčné fermentaci. Ke konci fermentace vylučován kvasinkami, ve víně je tudíž vyšší obsah než v moštu.

Niacin – až 3 mg/l v moštu, z toho dvě třetiny ve vázané formě, ve víně zůstává stabilní obsah 1 mg/l u bílých vín a 2 mg/l u červených. Během fermentace je spotřebováván kvasinkami, při jeho vyčerpání kvasinky značnou část regenerují.

Kyselina pantotenová – průměrně 1 mg/l vína, během uchovávání obsah klesá, růstový faktor pro kvasinky.

Pyridoxin – v moštu 0,4 mg/l, ve víně bílém až 0,6 mg/l a červeném až 0,7 mg/l.

Biotin – ve víně v rozmezí 2 – 5 µg/l dle různých autorů, v moštu o něco více, jeden z hlavních růstových faktorů kvasinek

Kyselina listová – v moštu řádově 2 µg/l, v červeném víně 2 – 10 µg/l, v bílém podstatně méně, pro mnohé mikroorganismy (např. mléčné bakterie) představuje pravý růstový faktor.

Kobalamin - syntetizován mikroorganismy v minimálním množství, ve víně dosahuje 0,1 µg/l.

Kyselina askorbová (Vitamin C) – v hroznech a moštu okolo 50 mg/l. Velká část se ztrácí v průběhu fermentace, hotové víno obsahuje 1 – 10 mg/l. Chrání víno před železitým zákalem a brání oxidaci aromatických látek. Evropská unie povoluje maximální obsah ve víně až 250 mg/l (Nařízení ES č. 606/2009), v praxi se užívá dávka 50 – 100 mg/l. (Michlovský, 2014a)

3.2.5. Dusíkaté látky

Dusík je hlavní složkou zemské atmosféry. Ve víně se vyskytuje ve formě bílkovin, jež se postupně ztrácejí (cca. 5 – 10 % celkového množství), polypeptidů (25 – 50 %), volných aminokyselin, jako prekurzorů aromatických látek (25 – 30 %), amoniakálního dusíku (3 – 10 %). Zbytek tvoří aminy a amidy.

Obsah a skladba dusíkatých látek v révě je dán genetickou dispozicí, dále klimatickými faktory, hnojením, zásobením vodou a zdravotním stavem. Je důležitý prvek pro výživu kvasinek, preferují jednoduché zdroje, např. amoniak či jednodušší aminokyseliny (*Saccharomyces cerevisiae* preferuje arginin). Během fermentace probíhá současně asimilace dusíkatých složek kvasinkami, zejména ve fázi rozmnožování, a vylučování dusíkatých látek mikroorganismy v prostředí, zvláště ve formě aminokyselin. Rovněž *Botrytis cinerea* využívá aminokyseliny ve své látkové výměně, tím snižuje jejich obsah.

Amoniakální dusík

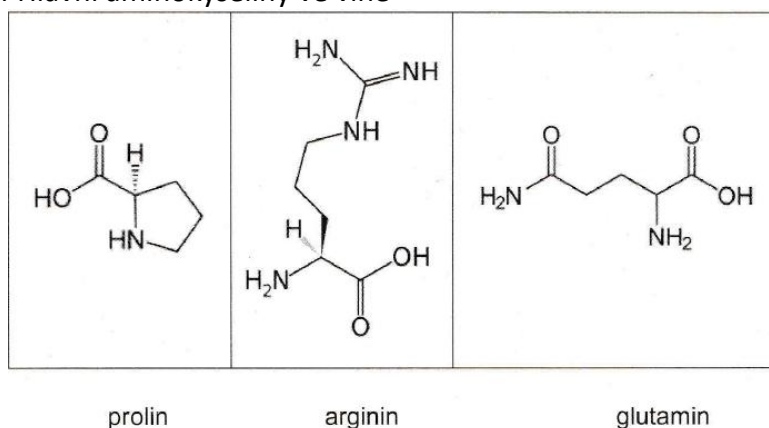
Jako jednoduchý zdroj dusíku pro kvasinky usnadňuje start alkoholového kvašení, legislativa umožňuje přídavek na počátku fermentace ve formě $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (max. 0,3 g/l) nebo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (max. 0,2 g/l). (Nařízení ES č. 606/2009)

Aminokyseliny

Sloučeniny kyselých karboxylových skupin (-COOH) a aminových skupin (-NH₂). Tvoří základní složky proteinů. V hroznech se vytváří vázáním amoniaku na organické ketokyseliny. Celkové množství tvoří 1 – 3 g/l. Jejich složení je velmi variabilní a v průběhu fermentace se působením kvasinek mění.

Nejvíce jsou ve víně zastoupeny prolin, arginin a glutamin, které dohromady tvoří 80 % všech aminokyselin.

Obr. 4 Hlavní aminokyseliny ve víně



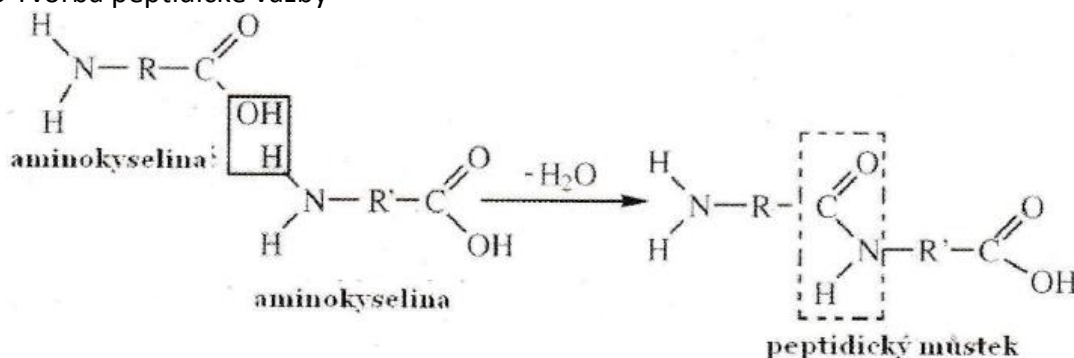
Zdroj: (Michlovský, 2014a)

Syrné aminokyseliny se vyskytují ve velmi malém množství a jsou obtížně stanovovány. Některé mohou ovlivňovat chuť: leucin, izoleucin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan – hořká; glycín, alanin, threonin, prolin – sladká. Délka nakvašování a vyšší teplota fermentace zvyšují jejich extrakci, proto mají červená vína v porovnání s bílými dvojnásobný obsah aminokyselin.

Peptidy

Peptidy vznikají spojením aminokyselin peptidickou vazbou (CO-NH) mezi karboxylovou skupinou jedné molekuly a aminovou skupinou druhé.

Obr. 5 Tvorba peptidické vazby



Zdroj: (Michlovský, 2014a)

Stejně jako sacharidy se dle počtu aminokyselin rozdělují na:

Oligopeptidy - 2 až 10 aminokyselin

Polypeptidy – 11 až 100 aminokyselinových jednotek s polymerním charakterem

Bílkoviny – více než 100 aminokyselinových jednotek

Z rozdělení vyplívá, že obsah peptidů, kromě obecných faktorů odrůdy révy a klimatických podmínek, ovlivňuje také polymerizace aminokyselin a rozklad bílkovin. Při termovinifikaci obsah polypeptidů stoupá třikrát více než celkový asimilovaný dusík, vysvětlení leží v termické denaturaci bílkovin hroznů během ohřevu rmutu. Do moštu se dostávají z třapin a semen, jejich obsah je tak dán intenzitou lisování a délkou kontaktu před odkalením. Takto vzniklé dusíkaté látky slouží jako zdroj živin pro bakterie uplatňující se při jablečno-mléčné fermentaci.

Glutation – tripeptid složený z kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu, jeho výskyt v moštu je přirozený, v závislosti na odrůdě až 100 µg/kg. Ve stavu oxidativního stresu je syntetizován kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*. V průběhu vinifikace může reagovat s chinony pocházejícími z oxidace fenolů (za pomoci enzymů polyfenoloxidáz). Vzniklý produkt blokuje proces hnědnutí.

Nisin – polypeptid složený z 34 aminokyselin, je syntetizován bakteriemi mléčného kvašení (*Lactobacillus lactis*) jako konkurenční výhoda v boji o životní prostor, na jiné bakterie totiž působí antibakteriálně.

Bílkoviny

Vysokomolekulární přírodní látky o relativní molekulové hmotnosti více než 10^4 . Kromě peptidových obsahuje i vazby disulfidové, esterové a amidové. Mohou být navázány i organické sloučeniny jako sacharidy, lipidy, nukleové kyseliny a další. Enzymy se řadí jako takzvané katalytické bílkoviny. Při inhibici enzymů ethanolem, nebo zabránění asimilace kvasinkami, se podíl bílkovin fermentací pozvolna zvyšuje. Jejich vysoká koncentrace je však ukazatelem nedostatečného číření. Použití oxidu siřičitého zvyšuje obsah proteinů. Jako termolabilní látky ovšem podléhají denaturaci, proto je jejich obsah ve víně prošlém termovinifikací nižší. To je vítáno z hlediska stability vína, z nutričního pohledu ale snižuje asimilaci vína při konzumaci.

Amidy karboxylových kyselin

Organické látky vzniklé náhradou -OH v karboxylové skupině (-COOH) za amidovou skupinu (-NH₂). Při hydrolýze se rozkládají na příslušnou aminokyselinu a amoniak.

Asparagin – amid kyseliny asparagové, neesenciální aminokyselina. Za vysokých teplot reaguje s redukujícími cukry za vzniku karcinogenního akrylamidu. Víno obsahuje řádově miligramy na litr této látky.

Ethylkarbamát – vzniká reakcí mezi ethanolem a močovinou (přítomnou ve víně v množství 1 – 10 µg/l), dodatečně je produkována působením bakterií mléčného kvašení na arginin. Po delším ležení koncentrace sloupá až na 5 - 10 µg/l.

Acetamid – odvozují se od amidu kyseliny octové a vyskytují se ve vínech kontaminovaných bakteriemi *Lactobacillus* nebo kvasinkami *Brettanomyces*. Už v malém množství vyvolávají pachů a zápach připomínající myší moč.

Ochratoxin A (OTA) – mykotoxin tvořen plísněmi rodu *Aspergillus*. Má nefrotoxické účinky (způsobuje nevratné poškození ledvin – neuropatii) a je podezříván z imunosupresivity (snižování imunity organismu), neurotoxicity a karcinogenity. V Evropské unii je od roku 2005 povolen maximální obsah 2 µg/l. (Michlovský, 2014a)

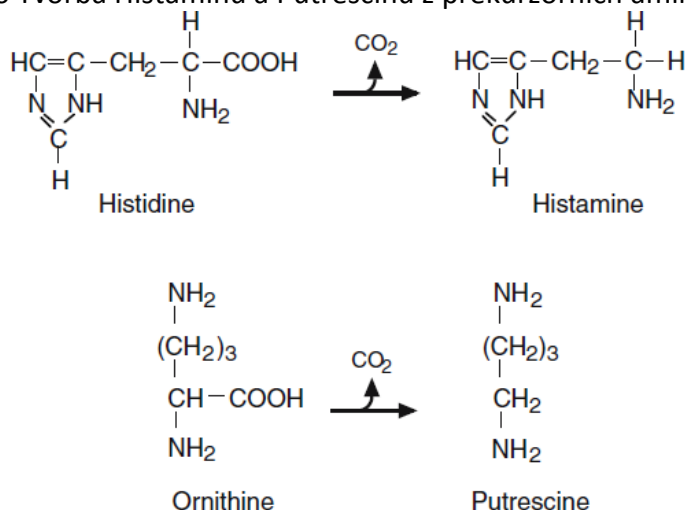
Biogenní aminy

Nízkomolekulární látky, avšak se značnou biologickou aktivitou, běžné metabolické produkty zvířat, rostlin a mikroorganismů. Aminy a diaminy jsou tvořeny dekarboxylací aminokyselin ve víně v průběhu vinifikace. Víno obsahuje asi dvacet aminů, jen několik z nich ale překračuje obsah jednotek mg/l.

Histamin – vzniká dekarboxylací histidinu. Může způsobit zúžení cév, migrénu či kopřivku, ve vyšších dávkách považován za toxický. Pravděpodobně produkován bakteriemi jablečno-mléčného kvašení. Průměrné množství dosahuje 3,9 mg/l v bílých vínech a 6,4 mg/l v červených. Některé státy legislativně stanovují maximální množství ve víně na 10 mg/l. (Michlovský, 2014a)

Kadaverin a Putrescin – vznikají dekarboxylací lyzinu a ornitinu. Označují se jako mrtvolné jedy, neboť vznikají při hnití masa. Ve víně dosahují koncentrací 5 mg/l.

Obr. 6 Tvorba Histaminu a Putrescinu z prekurzorních aminokyselin



Zdroj: (Fugelsang & Edwards, 2007)

3.2.6. Fenolické sloučeniny

Vinné hrozny obsahují mnoho antioxidantů. Nejúčinnější polyfenoly a hydroxyfenoly jsou obsaženy ve stoncích, slupkách a semenech. Přirozeně se koncentrují více ve víně než v ovoci. Kupříkladu červená vína mají asi pětkrát vyšší úroveň fenolů než čerstvé hrozny (Seldon, 1996). Díky tomu, že při výrobě červených vín dochází k fermentaci slupek společně s moštem, mají červená vína vyšší obsah fenolů, než bílá. Jejich další prospěšnou funkcí je například potlačení negativního vlivu kouření na plíce. (Burda, 2013)

Jsou přirozenými antioxidanty ve vinných hroznech. Jejich účinek je však zřejmě mnohem širší, neboť se uvádí do souvislosti s takzvaným „francouzským paradoxem.“ Ten je založen na epidemiologickém výzkumu iniciovaném světovou zdravotnickou organizací (WHO). Která, na základě údajů z dvaceti tří evropských zemí, přišla s výsledky, že podíl mortality na infarkt myokardu je nižší v tradičně vinařských zemích v porovnání se státy bez konzumace vína. Fenolické sloučeniny totiž vykazují protizánětlivé a protirakovinné vlastnosti, vedle toho zlepšují účinnost látek snižujících obsah cholesterolu v krvi a působí i proti virům. Jejich vliv na snížení kardiovaskulární úmrtnosti ale platí pouze za podmínky mírné konzumace vín při jídle, jelikož fenolové sloučeniny působí synergicky s alkoholem. (Michlovský, 2014a)

Díky svým pozitivním vlastnostem jsou polyfenoly z vína žádané ve farmacii. Extrahují se ze semen pro použití v léčivých pleťových krémech nebo ze slupek k přípravě nápojů pro sportovce. I díky tomu, že neovlivňují postřehnutelné sensorické vlastnosti, jsou doporučovány jako náhrada SO₂ při dlouhodobém uchovávání vína.

(González-Rompinelli et al, 2013)

Jmenujme například estery fenolových kyselin. Navázáním kyseliny skořicové s kyselinou chinovou vzniká jejich ester. Tyto skořicovochinové estery vykazují močopudné účinky a pomáhají snížit podíl cholesterolu. (Michlovský, 2014a)

Flavonoidy

Podstatou těchto sloučenin je centrální skelet se sumárním vzorcem C₆-C₃-C₆. Základní struktura je fenylobenzopyran, zkráceně nazývaný flavan. Ve víně způsobují hořkost. Často se na ně váží molekuly glukózy, jejich sloučeniny se pak nazývají glykosidy. Navázání glukózových jednotek také umožňuje větší rozpustnost flavonoidů ve vodně-alkoholickém prostředí. Glykosidy v průběhu vinifikace podléhají rozkladu a jsou hydrolyzovány na cukerné jednotky a centrální strukturu zvanou aglykon. V hotovém víně se nalézají už jen volné flavonové aglykony⁵.

Na barvě vína se pravděpodobně podílí železo slučované s některými fenolovými sloučeninami, jako například tříslovinami či organickými kyselinami.

Sloučenina kvercetin je schopna zabránit působení rakovinotvorných genů. Kromě vína se nachází v cibuli a česneku. V samotné potravíně je nečinný, k jeho aktivaci dochází pomocí fermentace nebo bakterií v zažívacím traktu. Častá konzumace potravin obsahujících kvercetin snižuje výskyt rakoviny žaludku, tlustého střeva i ostatních typů rakoviny. (Seldon, 1996)

Třísloviny

Jsou tvořeny širokou skupinou sloučenin povětšinou vzniklých kondenzací katechinů. Katechiny, jako samotné prekurzory kondenzovaných tříslovin, snižují hladinu cholesterolu v krvi, rozšiřují cévy, ale zřejmě mohou i podpořovat vznik migrény. Z tohoto důvodu se lidem náchylným k migréně nedoporučuje konzumovat taninová ani hutná červená vína⁶. Třísloviny po spojení s histaminem způsobují v těle reakce projevující se navenek bolestmi hlavy. Po skončení vinifikace se třísloviny slučují s volnými červenými pigmenty vína – antokyany, to napomáhá stabilizovat barvu hotového vína.

Třísloviny na bázi katechinů i epikatechinů se vyskytují ve slupkách a semenech jako kondenzované do kratších oligomerů (70 – 85 %) i velmi dlouhých řetězců (5 – 15 %).

⁵ v červených vínech 20 – 100 mg/l, v bílých vínech pouze stopová množství 1 – 3 mg/l (Michlovský, 2014a)

⁶ např. Bordeaux, australský Shiraz, italské Barollo a Barbaresco, argentinský Malbec, moravský Cabernet Sauvignon (Michlovský, 2014a)

Tato polyfenolická látka vytváří v mozku enzym regenerující nervová poškození. Uvádí se⁷, že již jedna sklenice vína denně může pomoci chránit před nervovými onemocněními. S tím souvisí menší riziko postižení demencí a Alzheimerovou chorobou u osob s pravidelnou mírnou konzumací vína. (Burda, 2013)

3.3. Mikroorganismy při výrobě vína

Mikroorganismy oplývají širokou škálou produkovaných sekundárních metabolitů, ať už ke své obraně (Například antibiotikum penicilin poprvé izolováno z mikroskopických hub rodu *Penicillium*) či ke svému užitku. V oblasti výroby vína se nejběžněji setkáme s bakteriálními, kvasinkovými nebo fungickými druhy vyskytujícími se zejména na obilovinách a různém ovoci včetně hroznů. Mají schopnosti produkovat těkavé vonné sloučeniny o koncentraci méně než mikrogramy na mililitr, následkem toho jsou bráni za původce organoleptických vad. (Michlovský, 2014b)

Tab. 1 Druhy kvasinek a plísní při výrobě vína

Vlastnosti	Příklady
Nefermentační druhy	<i>Cryptococcus sp.</i> , <i>Rhodotorula sp.</i> , <i>A. pullulans</i> , <i>Serratia sp.</i> , <i>B. vietnamiensis</i>
Fermentační druhy s nízkou tolerancí k alkoholu	<i>Candida sp.</i> , <i>Pichia sp.</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>G. oxydans</i>
Fermentační druhy tolerantní k alkoholu, ale citlivé na SO ₂ a živiny	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Oenococcus oeni</i>
Rezistentní druhy tolerantní k alkoholu, SO ₂ , nedostatku kyslíku a živin	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> , <i>Pediococcus parvulus</i>

Zdroj: (Silvano et al, 2013)

Nežádoucí mikroorganismy způsobují takzvané nemoci vína. Tyto nemoci nelze odstranit a víno se stává nepoživatelným. Mikroflóra je schopná narušit aroma vína takovým způsobem, že výsledný produkt je cítit jako myší moč s nepříjemně nahořklou chutí (odborně nazýváno Myšina). Aroma připomíná koňský pot, stáj nebo pach zmoklého psa (Koňský pot). Ve víně je cítit agresivní octová vůně i chuť (Octění vína). (Malík, 2003)

⁷ (Burda, 2013, str. 103)

3.3.1. Kvasinky

Spontánní alkoholové fermentace se účastní přirozená mikroflóra bobulí. Na počátku jde především o kvasinky rodu *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, v polovině procesu převládají *Pichia* a *Metschnikowia*, v konečné fázi *Saccharomyces cerevisiae* díky jeho vyšší odolnosti vůči alkoholu. Přítomny mohou být také nežádoucí kvasinky rodů *Torulasporea*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* a *Brettanomyces (Dekkera)* způsobující sensorické vady. (Michlovský, 2014b)

Saccharomyces

Kvasinky rodu *Saccharomyces* mohou rovněž vstřebávat kadaverin. Ale vydrží přítomnost cykloheximidu pouze při nižší koncentraci, než 10 mg/l. (Fugelsang & Edwards, 2007) Negativní vlastností těchto kulturních kvasinek při fermentaci je tvorba vedlejších produktů, z nichž asi nejméně oblíbený je sirovodík. Vyskytuje se ve víně jako přirozená součást fermentačního procesu, přičemž jeho množství je dáno použitým kmenem kvasinek. Je však nutno ho odstranit při čiření, neboť jeho zápach připomínající zkažená vejce není ve finálním produktu žádoucí. (Seldon, 1996) Je nutné si uvědomit, že rod *Sacharomyces* nedokáže využívat pětiuhlíkaté cukry (pentosy).

Candida

Candida mycoderma je původcem křísovatění vína. Toto onemocnění se objevuje u vín s nižším obsahem alkoholu. Při nedostatečném utěsnění může, u nenaplněných sudů docházet k přístupu vzduchu. Na hladině se pak tvoří charakteristický bílý nebo šedobílý povlak nazývaný křís. U vín s obsahem alkoholu 12,5 % a výše se s křísovatěním nesetkáváme. Vývoj mikroorganismu částečně brzdí také vyšší obsah tříslovin. Síření vína nepomáhá, protože dávky, které by vzniku křísu zabránily, jsou vyšší, než jaké povoluje vinařský zákon. (Pátek, 1998) Rod *Candida* dokáže fermentovat široké spektrum cukrů a některé druhy dokáží vstřebávat dusičnany. U *C. stellata* byla pozorována asimilace glukosy, sacharosy a rafinosy. Jiný zástupce *C. pulcherrima* fermentuje pouze glukosu, zato však vstřebává i galaktosu, sacharosu, maltosu, cellobiosu, ethanol, glycerol a sukcinát. (Meyer et al, 1998)

Hanseniaspora

Hanseniaspora uvarum, častý kolonizátor hroznových bobulí, také fermentuje glukosu a vstřebává s ní i cellobiosu či salicin. Dokáže růst i v přítomnosti cykloheximidu v koncentraci až 100 mg/l. (Ciani & Fatichenti, 1999) Méně rozšířená je takzvaná kyselá plíseň, která se objevuje při vyžrávání v teplém a vlhkém počasí a může lokálně těžce postihnout zdravotní stav hroznů. Podílí se na tom komplex aerobních kvasinek *Hanseniaspora uvarum* a octových bakterií. Více jsou k tomuto citlivé bílé hrozny. Napadení se projeví cihlově červenou barvou bobulí a mírným výtokem šťávy, současně je cítit ostrý pach kyseliny octové. Často se objevuje při vysokých teplotách přes 30 °C, které zabraňují růstu *Botrytis cinerea*, a velmi rychle se pak šíří. Mošt vyrobený z částečně postižených hroznů může obsahovat více než 1 g/l kyseliny octové či ještě více kyseliny glukonové. Vzhledem k obsahu ketonových sloučenin pocházejících z metabolismu octových bakterií, vykazují i vysoký stupeň vázání oxidu siřičitého. Vyrobené víno tak směřuje k předčasné fermentaci. (Michlovský, 2014b)

Pichia

Nacházíme také kvasinky rodu *Pichia*, konkrétně se jedná o druhy *Pichia anomala* a *Pichia membranifaciens*. Další zástupce tohoto rodu *Pichia guilliermondii* byl nalezen na bobulích a na vinařském náčiní. Vzhledem k tomu, že v hotovém víně se již nevyskytuje, lze usuzovat, že nepřežívají proces fermentace. Druh *P. anomala* dokáže fermentovat glukosu a sacharosu a vstřebává, mimo již zmíněné glukosu a sacharosy, široké spektrum látek včetně maltosy, cellobiosy, rafinosy, rozpustného škrobu, ethanolu, glycerolu, d-manitolu, salicinu, d-laktátu, sukcinátu, citrátu a dusičnanu. Za aerobních podmínek také vytváří film na hladině. Během fermentace vytváří 0,2 až 4,5 % alkoholu a potenciálně významné množství kyseliny octové, ethylacetátu isoamilacetátu. (Shimazu and Watanabe, 1981) Ve sledovaném moštu byl naměřen pokles celkové kyselosti a zvýšení pH. (Sponholz, 1993) Druh *P. membranifaciens* slabě fermentuje pouze glukosu a vstřebává podstatně méně látek, stále je však schopen asimilace glukosu a ethanolu.

Metschnikowia

Metschnikowia pulcherrima je další glukosu fermentující druh kvasinek. Zvláštností tohoto rodu je, že dokáže vstřebávat různé zdroje dusíku včetně kadaverinu, lysinu a ethylaminu. Je také schopný tolerovat přítomnost cykloheximidu v koncentraci 10 mg/l,

i když při zvýšení na 100 mg/l je již kompletně inhibována. Některé druhy produkují specifický červenohnědý pigment zvaný pulcherrimin. (Pallman et al, 2001) Díky své enzymatické aktivitě je tento rod schopen dodat do vína více sensoricky aktivních látek a formovat tak vyhledávaná odrůdová aromata. Pomocí enzymů kvasinky uvolňují terpenové sloučeniny, spojované s květinovou vůní, norisoprenoidy označované za „lapače vůní“ a pozitivní odrůdové thioly související s vůněmi citrusů a exotických plodů.

(Michlovský, 2014b)

Schizosaccharomyces

Rod *Schizosaccharomyces* se odlišuje unikátní formou rozmnožování, a to sice dělením. Pro kvasinky je běžné spíše pučení. *S. pombe*, přítomná jako jedna z primárních kvasinek na bobulích a v moštu, nedokáže získávat uhlík z ethanolu, ani využívat dusičnan jako zdroj dusíku. (Fugelsang & Edwards, 2007)

Zygosaccharomyces

Rod *Zygosaccharomyces* sdružuje devět druhů, z nichž *Z. bailii*, *Z. bisporous* a *Z. florentinus* jsou známy na bobulích a ve víně. (Kurtzman, 1998) Od jiných kvasinek se odlišují mnoha unikátními vlastnostmi. Například dokáží růst i v 60 % ním roztoku glukosy. (Thomas, 1993). Jsou také extrémně tolerantní k alkoholu, to dokazují tím, že rostou i ve víně o koncentraci 18 % alkoholu. (Thomas & Davenport, 1989) Inhibiční koncentrace různých látek pro tento rod zobrazuje příloha 2. Ale co je na nich nejzajímavější, je jejich výjimečná odolnost proti běžným konzervačním látkám, používaným ve vinařství. Jejich rezistence oxidu siřičitému se vysvětluje tvorbou extracelulárních sloučenin schopných vázat siřičitany, jde například o acetaldehyd. Mohou se zde uplatňovat i jiné, zatím neidentifikované, mechanismy. (Deak & Beuchat, 1996)

Dekkera

Můžeme se setkat i s bakterií s exotickým názvem *Dekkera*, jenž dodává vínu aroma a chuť žluklých kukuřičných lupínků. (Seldon, 1996) Jedná se o sporulující formu rodu *Brettanomyces*. Jejich působení na sensorickou komplexnost při zrání vína jsou předmětem diskuzí. Produkují značné množství kyseliny octové a některé druhy mohou používat ethanol jako zdroj energie. (Fugelsang & Edwards, 2007)

3.3.2. Bakterie

Nejběžnějšími bakteriemi schopnými projít fermentačním procesem a přežít vysoký obsah alkoholu jsou rody *Acetobacter* a *Lactobacillus*.

Acetobacter

Acetobacter xylinum je přirozenou složkou fermentujících vín, vytváří v nich malou leč přijatelnou hladinu kyseliny octové. Rovněž produkuje octan ethylnatý charakteristický pachem odlakovače na nehty. Ve velmi malém množství přispívají tyto sloučeniny ke komplexnímu aromatu vína. Za přítomnosti kyslíku však oxidace ethanolu na kyselinu octovou probíhá v mnohem větším měřítku, dokud není všechn alkohol spotřebován a z vína se pak stává ocet. Infekce hroznů plísní *Botritis cinerea*, při níž dochází k vypařování vody a koncentrování ostatních látek v bobuli, může dodávat octovým bakteriím důležitý zdroj glycerolu, jak napovídá nález kyseliny glukonové a keto glukonátů, které jsou považovány za metabolity bakterií. (Sponholz & Dittrich, 1985) Další zástupce rodu *A. oeni* je schopný růst ve víně i při obsahu 10 % ethanolu. (Silva et al, 2006)

Lactobacillus

Lactobacillus vytváří z alkoholu kyselinu mléčnou. Ale jelikož se jedná o heterofermentativní bakterii mléčného kvašení, vedle ní produkuje i mnohé vedlejší látky dodávající vínu komplexnost. Při přemnožení tvoří štiplavý a ostrý zápach po pelargoniích. (Seldon, 1996) Ve víně bylo identifikováno kolem 16 druhů této bakterie, výběr je zobrazen v příloze 3, ale jejich klasifikace je nejasná, některé nově objevené druhy jsou později přiřazeny k již existující linii, jiné jsou dosud málo prozkoumány.

(Fugelsang & Edwards, 2007)

Pediococcus

Jedna z nejnápadnějších bakterií schopnou mléčného kvašení je také *Pediococcus*. Na rozdíl od ostatních bakterií tvořících kyselinu mléčnou je však homofermentativní. To znamená, že nevytváří žádné další produkty. Ve víně se nejčastěji vyskytují *P. damnosus* (uveden v příloze 4) a *P. peniosaceus*. Jedná se o chemoorganotrofní organismy, jež vyžadují pro svůj růst komplex růstových faktorů a aminokyselin. Další odlišností je, že během reprodukce se dělí ve dvou rovinách, takže je můžeme pozorovat jako dvojice, čtveřice nebo větší shluky kulatých buněk. (Fugelsang & Edwards, 2007) Jejich přítomnost ve víně je striktně nežádoucí, neboť svým zápachem připomíná propocené ponožky. (Seldon, 1996)

Oenococcus

Oenococcus oeni (dříve *Leuconostoc oenos*) je další bakterií mléčného kvašení uplatňující se v průběhu jablečno-mléčné fermentace. Ačkoli se k tomuto kroku komerčně využívají jiné druhy. *O. oeni* také prokazuje schopnost tolerovat přirozené prostředí vína a transformovat dostatečné množství kyseliny jablečné v uspokojivém čase.

(Fugelsang & Edwards, 2007)

Bacillus

Ačkoli jde ve většině případů o půdní bakterie. Byly často pozorovány i v alkoholických nápojích. Druhy *B. subtilis*, *B. circulans* a *B. coagulans* se objevují ve víně. (Gini & Vaughn, 1962) *B. megaterium* byla dokonce zachycena v brandy. (Murrell & Rankine, 1979) Při kontrole infikovaných vín z Východní Evropy nebylo zjištěno žádné negativní ovlivnění aroma nebo sensorických vlastností, došlo pouze k tvorbě sedimentu a zákalu. (Kunkee, 1996) *B. thurgenensis*, která se běžně používá pro své insekticidní účinky na vinných hroznech, byla následně izolována i z vína. I přes prokázanou životaschopnost v tomto prostředí zatím nebyl pozorován její růst či rozmnožování ve víně. Zdá se, že růstové a generativní projevy byly v tomto médiu potlačeny. (Bae et al, 2004)

Clostridium

Tato bakterie byla pozorována výjimečně. Vzhledem ke svým nárokům se omezuje pouze na méně kyselé džusy a vína s pH vyšším než 4.0. Kvůli syntéze kyseliny máselné se projevují sensorické změny, víno dostává žluklou chuť. (Sponholz W. R., 1993)

3.3.3. Plísně

Botritis

Zařazení plísní ovšem nemusí být tak jednoznačné. Ačkoli je Plíseň šedá (*Botritis cinerea*) pro většinu vín považována za nežádoucí kontaminaci, pro takzvaná „botritická vína“ je to žádoucí mikroorganismus podílející se na výrobě. Šedá hniloba napadá všechny nadzemní části rostliny, zvláště pak zrající bobule, do kterých se dostává skrz mikroskopické trhlinky, jenž pak během svého růstu rozšiřuje. Po počáteční fázi růstu se bílé kolonie zbarví do šeda. Napadení *Botritis* lze snadno odhalit již v prvotním stádiu, jelikož dochází k hnědnutí bobulí až do čokoládového odstínu, známého jako *pourri plein*. (Donèche, 1993) Při napadení náchylných odrůd vznikají těžké škody na úrodě. Pokud jsou napadeny již zralé bobule

s cukernatostí nad 19°NM⁸, dochází k poškození slupky a tím k urychlení ztrát vody a zvýšení cukernatosti. Samotná plíseň také pro svůj růst spotřebovává glukosu a v bobuli pak zůstává obsažena pouze fruktosa. Pro výrobu botritických vín se pro tuto plíseň vžil pozitivně znějící název „ušlechtilá hniloba“. (Burda, 2013) Za optimálních podmínek teploty 15 až 20 °C a vlhkosti přes 90 %⁹ v okolí slupky je plíseň schopna růst velmi rychle, od vyklíčení po sporulaci za méně než 3 dny. Původně byly bobule napadány v podzimním období, ačkoli dnes již umělé zavlažovací systémy a další faktory jako mlha a rosa umožňují růst a šíření kolonií během celého vegetačního období. (Fugelsang & Edwards, 2007)

Na většině bílých hroznů jsou však nežádoucí, neboť zde narušují aromatické kvality suchých bílých vín a zeslabení odrůdových kvalit, větší nestálost fermentačních vůní a častější vznik vad ve vůni. *Botritis* totiž rozkládá vonné terpenoly v moštu muškátových odrůd (linalol, geraniol, nerol) na méně vonné sloučeniny přítomné v nekvašených bobulích (oxidy linalolu, alfa-terpineolu a jiné). U Sauvignonu dochází k oxidaci fenolových sloučenin a následně vzniklé chinony na sebe navazují vonné thioly, fungují tak jako „lapače odrůdových aroma Sauvignonu“. (Michlovský, 2014b) Plíseň dále uvolňuje exobuněčné enzymy esterázy, jejichž aktivita se v moštu dále udržuje. Jsou poté schopny katalyzovat rychlou hydrolýzu esterů produkovaných kvasinkami při alkoholové fermentaci. Víno tak může být ochuzeno o vůně po ananasu, banánu, jablku, jahodě, ostružině, medu, banánech, hrušce či cukrovém melounu, jež tyto estery vytvářejí. Lakáza vykazuje destrukční aktivitu vůči polyfenolům, včetně antokyanů. Při silné enzymatické aktivitě může během několika hodin dojít k proměně čerstvého červeného moštu na nahnědlý odvar, mezi vinaři známý jako „kaštanový bujón“. Delší působení během zrání způsobuje vyčerpání nebo vysychání vína v prvních stádiích jeho vývoje, toto bývá označováno jako zrychlené stárnutí vína. Stanovení stop aktivity lakázy je proto součástí všech základních kontrol, stanovuje se jak pro její vlastní roli, tak i jako celkový ukazatel zaplísnění *Botrytis*. Nevystačí na ní pouhé refraktometrické stanovení, neboť to je měřeno ve šťávě z dužiny, zatímco hlavní podstatné množství lakázy se nachází ve slupce.

Jisté je, že zdravé bobule zřetelně neobsahují lakázu, ta se vyskytuje pouze u nahnělých a její koncentrace stoupá během vadnutí bobule. Hrozny by měly obsahovat méně než 1 jednotku na mililitr, přičemž práh stanovení kolorimetrickou metodou leží na úrovni 0,5 jednotky/ml.

⁸ °NM (stupeň normalizovaného moštoměru) – jednotka pro měření cukernatosti (obsahu cukru) vína na základě jeho hustoty měřené speciálním hustoměrem nazývaným moštoměr

⁹ (Bulit & Lafon, 1970)

Tab. 2 Stav vývoje *Botrytis cinerea* na bobuli a aktivita lakázy v moštu

Stav vývoje <i>Botrytis</i>	Aktivita lakázy (v jednotkách/ml)*
Zdravé hrozny	0
Nahnilé bez konidiofory	1 – 2
Objevení se konidiofory	15 – 20
Zavadnutá hniloba	20 - 70

*) Jednotka lakázní aktivity odpovídá množství enzymu, schopnému oxidovat jeden nanomol syringaldazinu za minutu v podmínkách stanovení

Zdroj: (Grassin and Dubourdieu, 1989)

Penicillium

Kromě plísně šedé se na hroznech objevují i různé druhy rodu *Penicillium*. Jejich mycelium je snadno rozpoznatelné díky modrozelené barvě. Výskyt je spojován s deštivým počasím a nízkými teplotami pod 5 °C v době sklizně. Díky tomu získala plíseň v zahraničí název „cold weather mold“. Produkuje sloučeninu nazývanou geosmin, jež způsobuje nevíтанou zemitou odchylku ve víně. Její pach totiž připomíná vlhkou zeminu a řepu. (Michlovský, 2014b) *P. expansum* bývá často izolován a je známo, že napadá jablka, hrušky, rajčata, avokáda, manga a vinné hrozny. Je hlavním původcem obsahu mykotoxinu patulinu v ovocných džusech. (Fugelsang & Edwards, 2007)

Aspergillus

V teplých klimatických podmínkách se také setkáváme s hnilobou hroznů. Na bobulích je vidět mycelium nejprve bílé barvy, ale jak se plíseň šíří a konidie stárnou, barva tmavne a mění se na černou. Je to způsobeno infekcí *Aspergillus niger*. V zahraničí také známá jako „hot weather mold“, neboť roste za teplého počasí a napadá bobule poškozené po dešti. Při napadení ji často provází další plíseň rodu *Rhizopus* a octové bakterie podílející se na takzvané kyselé hnilobě hroznů. (Fugelsang & Edwards, 2007)

3.4. Kažení vína

Víno, jako produkt živých mikroorganismů, velmi citlivě reaguje na změny a vlivy z okolí. Proto je nutné při dlouhodobém skladování dodržovat určité podmínky. Negativní vliv na kvalitu má především sluneční světlo. Zvláště pak UV záření, jež proniká sklem lahve a způsobuje charakteristickou „pachuť světla“. Doporučuje se tedy skladování v tmavých místnostech, nejlépe se pro tento účel hodí sklepy. Rovněž je třeba zajistit, aby víno neleželo společně se silně aromatickými potravinami. Mohlo by totiž docházet k prostupování vůně skrz korek. Teplota musí být stabilní. Doporučuje se 12 – 18°C pro červená a 6 – 10°C pro bílá vína¹⁰. Je důležité, aby ve sklepech nedocházelo k žádným teplotním ani světelným výkyvům, také nesmí nastat průvan.

Zvýšená vlhkost samotnému vínu neškodí, hrozí však napadení mikroorganismy, které mohou proniknout špatně zajištěnou korkovou zátkou. Na druhou stranu je ale nezbytné se vyvarovat vysychání a křehnutí korku, z tohoto důvodu se lahve skladují ve vodorovné poloze, kdy je víno v přímém kontaktu se zátkou a zvlhčuje korek. Škodí také otřesy. Pokud sklep stojí v blízkosti zdrojů silných otřesů, například hlučné křižovatky, může dojít k opětovnému zakalení. Toto víno se dále nazývá zlomené. Tradičním vybavením vinných sklepů jsou proto police s oddělenými přihrádkami ze dřeva, jehož pozitivní vlastností je, že tlumí vibrace. (Burda, 2013)

V otázce jakosti se ohledně vína rozlišují nedostatky a vady.

Nedostatky vznikají většinou už v procesu výroby a jedná se o méně významné organoleptické změny. Patří mezi ně příliš vysoká nebo naopak nízká kyselost vína, velmi nízká extraktivnost, vysoký obsah tříslovin, vysoký či nízký obsah alkoholu, jemná oxidace vína, přesíření vína, silná neharmoničnost v chuti. (Malík, 2003) Pověštinou se technologicky odstraní při dalším zpracování a konečný spotřebitel se s nimi již neseťká.

¹⁰ (Association de la Sommellerie Internationale, 2001)

Vady jsou způsobeny špatnými technologickými a chemickými postupy či zásahy, nebo jejich kombinací. Odhalí se při smyslovém posouzení vína. Mezi nejčastější se řadí následující:

Vizuální znaky

Hnědnutí vína (oxidace) – projevuje se převážně u mladých, málo sířených vín. Projevuje se nahnědlým odstínem, přičemž hnědnutí je způsobeno přístupem vzduchu.

Krystalický zákal (vinný kámen) – vzniká vysrážením vinného kamene, nijak ovšem kvalitu vína nesráží.

Černý zákal – u červených vín je způsobuje obsah kovů

Bílý zákal – vzniká usazením kvasničných kalů na dně lahve, po roztřepání je vidět jako takzvané „sněžení vína“

Pachové znaky

Sirka – přítomností kvasinek vzniká sirovodík vyznačující se zápachem po zkažených vejcích

Chut'ové znaky

po třapínách – při lisování rmutu byl použit příliš vysoký tlak, došlo k rozdrčení třapin a vyluhování chlorofylu

po trávě – také rozdrčení třapin, nebo zpracování nezralých hroznů

po acetonu – došlo ke zpracování zapařených hroznů

po kvasinkách – kvasničné kaly byly odfiltrovány příliš pozdě

po dřevě – víno leželo v nových sudech

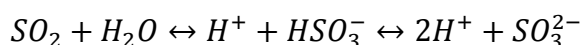
po korku – lahev byla uzavřena nekvalitní korkovou zátkou (Malík, 2003)

3.5. Možnosti konzervace vína

Hlavním a dosud nenahraditelným způsobem je síření vína. I když jsou již dlouho známy jeho nevýhody. Může způsobovat alergické reakce. Konzumace mladých ještě zasířených vín často způsobuje bolesti hlavy a škrábání v krku. (Michlovský, 2014b) Navíc není žádoucí ani ze sensorického hlediska, jeho vysoké dávky se kříží s buketem vína, neutralizují aroma a dodávají charakteristické vady, jako například dusivý a dráždivý pach namočené vlny a chuť spáleniny. (Michlovský, 2012)

Oxid siřičitý (SO₂)

Ve styku s vodou se oxid siřičitý (SO₂) přeměňuje na kyselinu siřičitou (H₂SO₃), ta v kyselém prostředí vína disociuje na hydrogen siřičitan (HSO₃⁻) a siřičitan (SO₃²⁻). Tyto disociované stavy se obecně označují jako volný SO₂.



(Michlovský, 2014a)

Používá se téměř na všechna vína v průběhu výroby od sklizně hroznů až po lahvování. Proti kvasinkám se může uplatnit na zastavení fermentace sladkých vín a jejich ochranou i před následnou refermentací způsobenou reziduální populací kvasinek. Jeho účinek zde závisí na použité dávce a také na pH. Při nízké dávce a vysokém pH působí spíše fungistaticky (zastavení rozmnožování buněk), naopak za nízkého pH a ve vysokých dávkách je fungicidní (zničení existující populace buněk), přičemž hydrogensiřičitan působí pouze fungistaticky. Průběžné několikanásobné zasíření během výroby však způsobuje pouze přechodnou inhibici kvasinek a při poklesu obsahu volného SO₂ dochází k obnově jejich fermentační činnosti (vliv zde ovšem může mít i kontaminace novými kvasinkami stykem s nesterilními nádobami a zařízením). Kvasinky inaktivují volný SO₂ tím, že ho převedou do vázané formy, která je neúčinná. Zasíření moštu před fermentací zvyšuje rezistenci kvasinek. Neboť, jak uvádí Michlovský (2012): "Izolované kvasinky z nezasířeného moštu po fermentaci vykazují vyšší citlivost vůči SO₂ než kvasinky pocházející ze stejného, ale zasířeného moštu." Pro dlouhodobé zastavení fermentace většiny vín uchovávaných při pokojové teplotě se doporučuje¹¹ dodat přibližně 1,50 mg/l molekulárního SO₂, nižší dávky jsou možné pro vína s malým obsahem kvasinek a při uchovávání za nízké teploty.

¹¹ (Michlovský, 2012, str. 64)

V kombinaci s přidavkem ušlechtilých kvasinek působí oxid siřičitý dobře také proti růstu nežádoucích kvasinek rodu *Dekkera*. Pomáhá také proti bakteriím mléčného kvašení, ačkoli zde je jeho aktivita mnohem více ovlivněna pH. Kupříkladu oxid siřičitý vázaný na acetaldehyl projevuje 5 – 10krát nižší účinnost než volný SO₂, ale jeho obsah může být 5 – 10 krát vyšší. (Michlovský, 2012) U vín s příliš vysokým pH se připouští dávky vázaného SO₂ v množství 80 – 120 mg/l k plné blokaci jablečno-mléčné fermentace. Z daných bakterií je proti působení oxidu nejméně rezistentní *Oenococcus oeni*, je citlivější než rody *Lacobacillus* a *Pediococcus*. Účinek na octové bakterie je nutný podpořit dalšími studiemi, je známo, že tyto bakterie odolávají poměrně vysokým dávkám. Pro ochranu vína se tedy v praxi dosud spoléhá na prevenci zamezením kontaktu se vzdušným kyslíkem a řízením teploty sklepa.

Je jasné, že baktericidní působení je zajištěno ne volným oxidem siřičitým (SO₂), ale jeho vázanou formou, jež ve víně trvale působí po celou dobu vinifikace i během uchovávání vína.

Tab. 3 Limity použití SO₂ v bílém víně

Druh vína	mg/l
Červené víno	150
Bílé a růžové víno	200
Červené víno od 5 g/l cukru	200
Bílé a růžové víno od 5 g/l cukru	250
Pozdní sběr	300
Výběr z hroznů	350
Výběr z bobulí, výběr z cibéb, ledové víno, slámové víno	400
Likérové víno s obsahem cukru pod 5 g/l	150
Likérové víno s obsahem cukru od 5 g/l	200
Šumivé víno jakostní	185
Šumivé víno ostatní	235

Zdroj: (Nařízení ES č. 606/2009), upravil: (Michlovský, 2014a)

V menší míře je produkován kulturními kvasinkami, takto vzniklý SO₂ může dosahovat hodnot často 50 mg/l, u speciálních kmenů dokonce 100 mg/l. (Michlovský, 2012)

Lakáza

Enzym lakázu, produkovaný plísní *Botrytis cinerea*, lze využít i ke stabilizaci vína. Je zde nutno dodržet několik podmínek, například optimální pH okolo 2,5 – 4,0. Byly provedeny pokusy s enzymem získaným z vyšší houby Outkovky pestré (*Trametes versicolor*), který má optimální pH na hodnotě 2,7. Následné výsledky ukázaly eliminaci až 70 % katechinů a 90 % antokyanidů již po třech hodinách. To napovídá o možnosti využití lakázy jako čeridla s následným přidáním roztoku oxidu křemičitého nebo tepelným ošetřením. Jako poslední krok se doporučuje aplikovat ultrafiltraci pro odstranění oxidovaných produktů a enzymového proteinu. Z předběžných studií také vyplývá, že tento enzym má vysoký potenciál k odstraňování fenolových sloučenin z vína. Při pokusech bylo dosaženo odstranění více než 90 % ferulové kyseliny z modelového roztoku a 34 % pokles fenolových sloučenin z vína.

Vedle toho má lakáza široké spektrum použití například v bioremediaci odpadních vod potravinářského průmyslu, výroba ovocných šťáv, stabilizace piva, spektrofluorimetrickém stanovení askorbové kyseliny ve víně, pivu, farmaceutických preparátech, sušeném mléku aj. Dále při zlepšování organoleptických vlastností potravin a jako biosenzor pro imunoanalýzu.

(Minussi et al, 2002)

Resveratrol

Jedná se o difenolickou sloučeninu (obsahuje dva fenolové cykly) řadící se do skupiny stilbenů. Vykazuje protirakovinné vlastnosti a chrání také proti onemocněním nervového systému (zejména Alzheimerova choroba). Proběhly již pokusy s jeho využitím proti akné (Fabbrocini et al, 2011) a jejich výsledky byly pozitivní, navíc se při užívání ve formě masti nevyskytly žádné vedlejší účinky. Nachází se především ve slupce, ale může být i v semenech, jeho role je ochrana révy před UV záření a útoky mikroorganismů, zejména mikroskopickým houbám vyvolávajícím hnilobu hroznů. V červených vínech je obsažen v množství 1 – 10 mg/l. (Michlovský, 2014a) V severnějších pěstebních lokalitách dosahuje vyšší množství (až 15 mg/l¹²), než v jižních oblastech, důvodem jsou méně vyhovující klimatické podmínky a vyšší tlak ze strany mikroorganismů. Vyskytuje se ve vyšším měřítku u odrůd pěstovaných v severních klimatických podmínkách, nejvyšší obsah je produkován odrůdou Pinot noir. Nejčastěji se nachází v glykosidované formě s navázanou molekulou glukózy.

¹² (Kolouchová-Hanzlíková et al, 2004)

Lysozym

Enzym přirozeně se vyskytující ve vaječném bílku. Je využíván také ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu. Katalyzuje rozklad polysacharidové řetězce v buněčných stěnách bakterií. Pro člověka je netoxický. Na rozdíl od SO_2 jeho aktivita vzrůstá se zvyšujícím se pH. V enologii se využívá pro regulaci množství mléčných bakterií, nepůsobí však na octové bakterie a rod *Brettanomyces*. Proto se používá v kombinaci s SO_2 .

V Evropské unii je povoleno jeho přidávání do vína od roku 2001 a to v maximální dávce 500 mg/l. Není však povolen u biovín a od roku 2012 musí jeho použití být výslovně uvedeno na etiketě. (Prováděcí nařízení komise (EU) č. 203/2012)

Vzhledem ke svému bílkovinnému základu je tepelně nestabilní, vytváří zákal při teplotě 50 °C a vyšší. Je nutno jej přidávat v krystalické formě, neboť při přidávku vaječného bílku do vína neprojevuje žádný vliv ani ve vysokých dávkách. To se vysvětluje tím, že lysozym se z bílku během číření neuvolňuje a je vysrážen tříslovinami s obsahem bílkovin. (Michlovský, 2012)

Dimethyldikarbonát (DMDC)

Přidává se při lahvování vína pro zajištění mikrobiologické stability u vín s obsahem zkvasitelných cukrů a částečně zkvašeného moštu (burčák). Maximální povolené množství je 200 mg/l a ve víně nesmí být zjištěna žádná rezidua. Stejně jako lysozym není povolen pro biovína.

Působí nejen na vinné kvasinky, ale i na kontaminující rody, v menší míře projevuje rovněž baktericidní účinek. Je také nezbytné doplnit lahve určitým množstvím volného SO_2 k ochraně před oxidací vína.

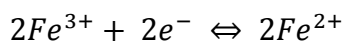
Při jeho odbourávání vzniká hlavně methanol a oxid uhličitý (CO_2). Methanol je silně toxický. Michlovský (2012) uvádí, že rozklad 200 mg/l DMDC teoreticky vytvoří 96 mg/l methanolu. To splňuje doporučení Mezinárodní organizace pro révu a víno (OIV), která stanovuje limit 300 mg/l methanolu pro červená vína a 150 mg/l pro bílá. (Castellucci, 2004)

Kyselina askorbová

Známa jako vitamin C se přirozeně vyskytuje v ovocných plodech, v menším množství i v hroznech. V průběhu fermentace a také při styku se vzduchem se ztrácí, ve vínech se tedy zpravidla nevyskytuje. Je dokonale rozpustná ve vodě a její aplikace nezpůsobuje problémy.

Roztok je nutno připravovat těsně před aplikací a účinně homogenizovat, aby nedocházelo k uvolňování kyslíku, například ve směsi s SO₂.

V enologii se využívá její oxidovaná forma kyselina dehydroaskorbová, která má redukční účinky. Při této reakci se uvolňují 2 elektrony (e⁻), jenž se podílí na redukci složek vína, zejména železitých iontů. Tím se vysvětluje účinnost při prevenci železitého zákalu, vyvolávaného výlučně železitými ionty (Fe³⁺).



(Michlovský, 2012)

Ke zpětné redukci na kyselinu askorbovou nedochází, protože kyselina dehydroaskorbová je nestálá a ztrácí se.

Přídavek kyseliny askorbové je účinný pouze, pokud je omezen kontakt se vzduchem. Dobře chrání proti malým postupným aeracím při lahvování, nemá ale význam pro dlouhodobé skladování v nádobách či sudech. V přítomnosti vyššího množství kyslíku se ovšem oxiduje za vzniku peroxidu. Ten je nežádoucí, neboť může vyvolat hluboké změny ve víně. Jako ochranu je nutno použít dostatečné množství volného SO₂, jenž je peroxidem přednostně oxidován.

Změny aroma nebyly ve vínech zaznamenány. Pouze odrůdy Sauvignon, Müller Thurgau a Veltlínské zelené vykazovali výraznější tóny citrusů a exotického ovoce. (Michlovský, 2012)

Kyselina sorbová

Samotná kyselina je špatně rozpustná ve vodě¹³ a naopak dobře zorpustná v ethanolu¹⁴. Proto se k ošetření vína používají roztoky jejích sodných a draselných solí připravované v okamžiku aplikace. Na mikrobiální účinnost má velký vliv hodnota pH. Čím je nižší, tím větší je aktivita kyseliny. Pro zabránění refermentace sladkého vína je nutné použít 150 mg/l kyseliny sorbové při pH 3,1. Za stejných podmínek ale vyššího pH (3,5) je nutno dávku zdvojnásobit na množství 300 mg/l. (Michlovský, 2012)

Je účinná jak proti klasickým fermentačním kvasinkám, tak i k rodům způsobujícím křís na povrchu. Proti bakteriím jsou její vlastnosti méně výrazné, nemá žádný účinek na octové nebo mléčné bakterie. Naopak SO₂ má vyšší účinnost na bakterie než na kvasinky. Proto je velmi vhodné použití kombinace kyseliny sorbové a SO₂.

¹³ ve vodě lze rozpustit: 1,6g/l při 20 °C, 5,0 g/l při 50 °C (Michlovský, 2012)

¹⁴ v ethanolu lze rozpustit: 112 g/l při 20 °C (Michlovský, 2012)

4. Materiál a Metody

Na praktický experiment bylo použito nesířené víno Sur de Lie (Vinařství Koráb, Boleradice, Česká republika) a rovněž nesířený mošt Malverina (vinařství Vinselekt Michlovský, Rakvice, Česká republika).

4.1. Chemikálie

Resveratrol (99 %) (BDL, Turnov, Česká republika), jelikož se jedná o látku velmi špatně rozpustnou ve vodě, byly použity následující rozpouštědla: Ethanol p.a. (Penta, Praha, ČR), Dimethylsulfoxid (DMSO) (Lach-Ner, Neratovice, ČR), Tween (80 %) (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika), Polyethylenglykol (PEG) (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika), Cyklodextrin (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika).

Přesná koncentrace resveratrolu ve vytvořeném cyklodextrinovém komplexu byla ověřována HPLC metodou za použití Acetonitrilu, Acetonu, Deionizované vody, Kyseliny orthofosforečné.

Chlorid sodný (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) byl použit pro přípravu fyziologického roztoku jako média pro inokulum mikroorganismů.

Barvivo Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) k lepší identifikaci bakteriálního nárůstu rodu *Staphylococcus*, použitého u stanovení MIC (minimální inhibiční koncentrace).

Resveratrol byl špatně rozpustný a docházelo ke zpětnému vysrážení, které mohlo být posuzováno jako zákal vytvořený bakteriální kulturou a zkreslit tak výsledky stanovení.

Glukóza (Oxoid, Brno, ČR) byla přidávána do vína a moštu pro podporu růstu mikroorganismů. Pro úpravu pH moštu a vína byl použit Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) a Kyselina chlorovodíková (Lach-ner, Neratovice, Česká republika).

4.2. Mikroorganismy

Ze získaných poznatků o výrobě a chemickém složení vína jsme identifikovaly hlavní kontaminující kvasinky rodu *Saccharomyces* a *Zygosaccharomyces*, za zástupce bakterií byl vybrán mimojiné rod *Acetobacter*. Pro rozšíření spektra i mimo oblast vinařství byl přidán také *Staphylococcus aureus* jako jeden z hlavních kontaminujících mikroorganismů v potravinářském průmyslu.

Použito bylo celkem osm kmenů *Staphylococcus aureus*, z toho šest standardních kmenů ATCC (American type culture collection - ATCC 25923, ATCC 29213, ATCC 43300,

ATCC 33591, ATCC 33592, ATCC BAA976), bylo zakoupeno z Oxoid Basingstoke UK a dva klinické izoláty (KI) získané z Národní referenční laboratoře pro dezinfekci a sterilizaci, Státní zdravotní ústav, Praha, ČR. Dále použité kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (DSM 70449), *Zygasaccharomyces bailii* (DSM 70492) a *Z. rouxii* (DSM 70540) zakoupené u German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany), stejně jako *Acetobacter oeni* (DSM 23926) a *A. aceti* (DSM 3508).

Další mikroorganismy - *Pediococcus damnosus* (CCM 3453), *Lactobacillus brevis* (CCM 7932) a *Acetobacter estunensis* (CCM 3613) byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM).

4.3. Kultivace

Kultivační médium mikroorganismů:

SD bujon (Sabouraud-dextrose broth) (Oxoid, ČR)

BHI bujon (Brain Heart Infusion broth) (Oxoid, ČR)

MRS bujon (de Man, Rogosa and Sharpe broth) (Oxoid, ČR)

MH bujon (Mueller-Hinton broth) (Oxoid, ČR)

4.4. HPLC analýza

Obsah resveratrolu v cyklodextrinovém komplexu byl ověřen pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie, prováděné na Katedře kvality zemědělských produktů České zemědělské univerzity za použití kapalinového chromatografu LC500 (INGOS, Praha, Česká republika) opatřeném kolonou RP-18e (5 µg) a UV VIS detektorem. Pracovní teplota byla nastavena na 24 °C. Cyklodextrinový komplex připravený dle kapitoly 3.5.2. o objemu 20 µl byl injekčně vpraven do kolony. Jako mobilní fáze byl použit 25 % ní roztok acetonitrilu v deionizované vodě s upraveným pH pomocí kyseliny orthofosforečné na hodnotu 3,0. Metoda probíhala isokratickou elucí konstantní rychlostí 1,5 ml/min. Detektor byl nastaven na 306 nm. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí lineární kalibrační křivky.

4.5. Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC)

4.5.1. Makrodiluční bujónová metoda

Tyto pokusy byly prováděny ve zkumavkách o objemu 10 ml, do kterých byly napipetovány 2 ml vzorku moštu, měřeno spektrometricky na přístroji Helios Epsilon, při vlnové délce 405 nm.

Pro podporu růstu bakterií a kvasinek ve víně byla do vzorků vína přidána glukóza. Byla připravena ředící řada o koncentraci 128 mg/l až 2 mg/l. Densita inokula, připraveného ve fyziologickém roztoku, byla navýšena o 2 Mc Farland stupně. Zaočkované vzorky vína s obsahem glukózy byly kultivovány v termostatu při 25 °C.

Dále byl pro podporu růstu kvasinek ve vzorcích vína přidáván bujon. Do vzorků vína byl přidán SD bujon v obsahu 10 – 90 % objemu celkového roztoku. Po přidání 20 µl inokula do zkumavky s roztokem 1800 µl vína a 180 µl bujonu bylo dosaženo celkového objemu 2000 µl. Obdobným způsobem byla vytvořena ředící řada 380, 580, 780, 980, 1180, 1380, 1580 a 1780 µl bujonu s příslušným objemem vína vždy na celkový objem 2000 µl po přidání 20 µl inokula. Připravené roztoky ve zkumavkách byly zaočkovány 20 µl inokula kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* přidaných do SD bujonu na zvýšení density o 2 McFarland stupně. Byla provedena dvojice kontrol růstu smícháním 1980 µl vína s 20 µl inokula a dvojice kontrol čistoty s obsahem 1980 µl vína a 20 µl bujonu.

Po zjištění vhodného přídávku bujonu byl přidán resveratrol. Jeho inhibiční účinek byl měřen spektrofotometricky přístrojem Helios Epsilon při vlnové délce 405 nm. Pokusy byly prováděny s kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* a bakteriemi *Acetobacter oeni*. Inokulum bylo připraveno v bujonu SD o densitě zvýšené o 2 stupně McFarland a následně zaočkováno do směsi vína s 15 – 25 % bujonu SD. Také inokulum bakterií *Acetobacter oeni* připraveno stejným způsobem zaočkované do směsi vína s 25 – 35 % bujonu SD. Resveratrol o koncentraci 514 mg/l v případě kvasinek a 380 mg/l pro bakterie byl rozpuštěn v ethanolu. V obou případech byla provedena kontrola růstu zaočkovaného bujonu a kontrola čistoty samotného bujonu, samotného vína a směsi 1980 µl vína s 20 µl bujonu SD.

Pokusy s rozpouštěním samotného reveratrolu ve víně a moštu byly prováděny ve dvou skleněných penicilinkách, do kterých byl navážen resveratrol a do jedné přidán mošt, druhá byla zalita vínem. V obou penicilinkách byla koncentrace resveratrolu 1024 µg/ml.

Po překrytí aprafilmem byly míchány na míchačce s použitím magnetu po dobu 48 hodin při pokojové teplotě. Každých 12 hodin byla vizuálně posouzena rozpustnost.

Rovněž bylo posuzováno možné ovlivnění růstu kvasinek samotným DMSO, za účelem zjistit, zda je možné ho přidávat k podpoře rozpustnosti ve vyšším obsahu než 1 %. Test proběhl ve zkumavkách za použití kmenů *Zygosaccharomyces*. Inokulum bylo připraveno do SD bujonu se zvýšením hustoty buněk o 2 McFarlandy. Do zkumavek byl připraven bujon s 1 – 10 % DMSO a přidáváno 25 µl inokula. Celkový objem ve všech zkumavkách byl 2500 µl. Tedy u 1 % ní koncentrace bylo připraveno 2450 µl bujonu s 25 µl DMSO a 25 µl inokula. Kontrola růstu byla stanovena 2475 µl bujonem s 25 µl inokula. A kontrola čistoty pouze s 2500 µl čistého bujonu. Kultivováno v termostatu při 25 °C a průběžně měřena optická densita přístrojem Helios Epsilon při vlnové délce 405 nm.

4.5.2. Mikrodiluční bujónová metoda

Nejdříve bylo zkoušeno navázat resveratrol do komplexu s cyklodextrinem. Příprava byla provedena podle metody B. R. Bhandariho et al (1998) 500 mg cyklodextrinu bylo rozpuštěno v 15 ml destilované vody o teplotě 60 °C. Po zchlazení na 40 °C bylo pomalu přidáváno 100,25 mg resveratrolu rozpuštěného v 100,28 mg ethanolu (poměr resveratrolu a ethanolu 1:1) za stálého míchání. Míchání pokračovalo po dobu 3 hodin v uzavřené nádobě. Vzniklá kaše byla přes noc zchlazena v lednici na 4 °C. Studená sraženina byla obnovena vakuovou filtrací a promyta 1,5 ml deionizované vody a 1,5 ml ethanolu, následně vysušena ve vakuové sušárně při 75 °C po dobu 24 hodin. Vysušený komplex byl uchováván v lednici.

Komplex o koncentraci 1024 µg se přímo nerozpouštěl ve zkoušených bujonech (MH jako živné médium bakterií *Staphylococcus* a SD pro kvasinky *Saccharomyces*). Vzhledem k nerozpustnosti komplexu v bujonech a ethanolu bylo dále zkoušeno rozpustit komplex v DMSO. Rozpouštění probíhalo pouze s pomocí vortexu aby nedošlo k porušení komplexu. Vzhledem k časové i finanční náročnosti přípravy komplexu proběhl test pouze jednou. Pokus byl prováděn na mikrotitrační destičce, naočkováno inokulem SD bujonu s bakterií *Staphylococcus* (densita navýšena o 2 McFarland stupně). Resveratrol o koncentraci 420 µl/ml byl rozpouštěn v DMSO a v ethanolu. K inokulu bylo přidáno 25 a 30 % bujonu. Rovněž byla provedena kontrola čistoty se samotným vínem a čistým bujonem a kontrola růstu pouze s inokulem naočkovaným do bujonu.

Antimikrobiální aktivita byla zjišťována bujónovou mikrodiluční metodou za použití standartních 96-ti jamkových destiček dle CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Pokus byl prováděn na třech identických destičkách v sérii tří opakování. Do jamek bylo napipetováno po 100 μ l MH bujonu. Ke 198 μ l bujonu byly přidány 2 μ l resveratrolu (kvůli riziku ovlivnění koncentrace během rozpouštění a manipulace s látkou byl resveratrol rozpuštěn v DMSO, nikoli v ethanolu) k docílení koncentrace 512 μ l, následně byl roztok rozředěn dvojnásobnou geometrickou ředící řadou na koncentrace 256 μ l, 128 μ l a 64 μ l. Pro kontrolu růstu posloužilo 100 μ l bujonu zaočkovaného příslušným kmenem bakterií a ke kontrole čistoty bylo použito 100 μ l čistého bujonu. Kontrola zákalu obsahovala 98 μ l bujonu a 2 μ l resveratrolu.

Následně bylo přidáno osm vybraných kmenů bakterie *Staphylococcus aureus* (inokulum se zvýšením density o 0,5 McFarland stupně), jež byly zaočkovány do ředící řady bujonů s resveratrolem a v kontrole růstu. Následně proběhlo měření počáteční optické density na přístroji TECAN Infinite M200 při 405 nm a poté byly kultivovány v termostatu po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Po uplynutí doby proběhlo druhé měření optické density destiček při 405 nm. Poté bylo do všech jamek přidáno 40 μ l roztoku barviva Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide o koncentraci 600 μ l a změřena optická densita po obarvení při 570 nm.

4.6. Příprava inokula kvasinek ve fyziologickém roztoku

Fyziologický roztok byl připraven rozpouštěním chloridu sodného v destilované vodě na koncentraci 9 g/l (koncentrace odpovídající osmotickému tlaku krevní plazmy). Kvasinkové kmeny byly rozkultivovány 24 hodin předem v termostatu při 25 °C. Po nárůstu byly rozmíchány vortexem, odebrán vzorek do Eppendorfovy zkumavky a odstředěn v centrifuze. Poté byl slit bujon a přidán fyziologický roztok. Kultura byla celkem třikrát odsředěna a prolita fyziologickým roztokem. Po třetím opakování byl roztok přidáván do čistého fyziologického roztoku do navýšení density o 2 McFarlandy. Tato metoda byla zvolena pro přiblížení se potravinovému modelu. Do vína či moštu by byly přidávány mikroorganismy ve fyziologickém roztoku. Později musela být metoda modifikována pro inokulum mikroorganismů v bujonu. Zásobní kultury mikroorganismů byly uchovávány v lednici.

5. Výsledky

5.1. Vývoj modelového (vinného) média

MRS bujon byl posouzen jako nejvhodnější médium pro růst bakterií. Jeho tmavá barva však neumožňuje měření optické density, proto byla vytvořena směsná média.

Připraveny směsi: 250 ml SD + 25 ml MRS \Rightarrow MRS + SD

225 ml BHI + 15 ml MRS \Rightarrow MRS + BHI

Zaočkované sterilní směsi byly kultivovány v termostatu po dobu 48 hodin při 37 °C. Poté byl vizuálně posouzen nárůst na dně zkumavky.

Tab. 4 Růst bakterií na různých typech bujonu

Bujon	Bakterie				
	AO	AE	PD	LB	AA
MRS+SD	xxx	x	xxx	xxx	0
MRS+BHI	xx	x	xx	x	x
BHI	xxx	x	xx	x	0

Zdroj: autor

xxx – silný nárůst, xx – středně silný nárůst, x – slabý nárůst, 0 – žádný nárůst

AO - *Acetobacter oeni*, AE – *A. estunensis*, AA – *A. aceti*, PD - *Pediococcus damnosus*,

LB - *Lactobacillus brevis*

Nejlépe se projevil nárůst *Acetobacter oeni*, druhý nejlepší byl *Pediococcus damnosus*. Slabý nárůst u *Acetobacter estunensis* a *Acetobacter aceti* byl pro další pokusy nevhodný. K dalšímu měření byl vyhodnocen, jako nejlepší kmen, *Acetobacter oeni*.

Nárůst bakterií v médiu obohaceném glukózou v množství 128 mg/ml byl měřen spektrofotometricky na přístroji Helios Epsilon při vlnové délce 405 nm. Výsledky shrnuje příloha 6. Nepodařilo se dokázat, že by přidavek glukózy do zkoušených vzorků vína pozitivně ovlivnil růst mikroorganismů.

Po dobu 10 denní kultivace kvasinek ve víně s přidavkem bujonu v termostatu při 25 °C bylo průběžně prováděno měření na spektrometru Helios Epsilon při vlnové délce 405 nm.

Tab. 5 Nárůst kvasinek v médiu vína a bujonu, měřena optická densita

Obsah bujonu SD	Datum měření							
	18.2.	19.2.	20.2.	23.2.	24.2.	25.2.	26.2.	27.2.
10%	0,427	0,438	0,441	0,451	0,455	0,465	0,467	0,468
20%	0,473	0,485	0,489	0,785	0,791	0,826	0,824	0,84
30%	0,501	0,518	0,716	1,695	1,905	2,03	2,11	2,002
40%	0,542	0,572	1,247	1,526	1,549	1,587	1,6	1,604
50%	0,577	0,634	1,483	1,818	1,84	1,904	1,948	1,96
60%	0,616	0,81	1,707	2,492	>2,590	>2,658	>2,647	>2,663
70%	0,648	1,046	1,927	2,312	2,311	2,346	2,45	2,386
80%	0,692	1,345	2,058	2,243	2,27	2,43	2,353	2,328
90%	0,739	1,331	2,123	2,304	2,355	2,429	2,329	2,395
Kont. růstu 1	0,739	1,213	2,126	2,199	2,243	2,243	2,265	2,339
Kont. růstu 2	0,795	1,201	2,15	2,301	2,246	2,286	2,286	2,308
Kont. čistoty 1	0,424	0,436	0,435	0,452	0,45	0,463	0,465	0,473
Kont. čistoty 2	0,428	0,438	0,442	0,451	0,462	0,471	0,481	0,478

Zdroj: autor

Z tohoto pokusu byl stanoven optimální přidavek bujonu do vína pro *Saccharomyces cerevisiae*, tedy 15 – 25 % SD. Toto množství bylo dále použito k dalším testům.

Po zjištění vhodného přídatku bujonu byl přidán resveratrol. Sledoval se nárůst kvasinek a bakterií v médiu vína s bujonem proti médiu s přidáním resveratrolem. Po dobu 24 denní kultivace v termostatu při 25 °C bylo průběžně prováděno měření na spektrometru Helios Epsilon při vlnové délce 405 nm.

Tab. 6 Nárůst kvasinek v médiu vína a bujonu po přidavku resveratrolu

Inokulum	Přídavek SD	Datum měření								
		25.2.	26.2.	27.2.	2.3.	3.3.	5.3.	9.3.	11.3.	13.3.
Kvasinky Sc	15%	0,455	0,467	0,472	0,54	0,63	0,653	0,709	0,728	0,753
	20%	0,474	0,484	0,499	0,77	0,795	0,883	0,946	1,017	1,008
	25%	0,49	0,51	0,552	0,919	0,953	1,014	1,143	1,182	1,222
Kont. růstu		0,793	1,31	2,097	2,224	2,227	2,298	2,336	2,38	2,4
Kont. čistoty	SD	0,792	0,812	0,818	0,819	0,826	0,824	0,829	0,829	N
	víno	0,405	0,413	0,418	0,437	0,436	0,444	0,455	0,46	0,463
	víno + SD	0,403	0,418	0,417	0,439	0,437	0,442	0,462	0,471	0,468
Resveratrol	15%	0,505	0,753	0,769	0,811	0,841	0,827	0,853	0,851	0,889
	20%	0,469	0,48	0,513	0,53	0,526	0,539	0,645	0,68	0,779
	25%	0,483	0,498	0,514	0,618	0,881	0,956	1,028	1,112	1,152

Zdroj: autor, N – neměřeno

Tab. 7 Nárůst bakterií v médiu vína a bujonu po přidavku resveratrolu

Inokulum	Přídavek SD	Datum měření							
		26.2.	27.2.	2.3.	3.3.	5.3.	9.3.	11.3.	13.3.
Bakterie A. oeni	25%	0,396	0,425	0,47	0,501	0,56	0,715	0,764	0,809
	30%	0,391	0,408	0,535	0,566	0,638	0,757	0,796	0,803
	35%	0,384	0,412	0,625	0,673	0,763	0,821	0,88	0,911
Kont. růstu		0,384	0,416	0,537	0,594	0,645	0,73	0,789	0,813
Kont. čistoty	SD	0,385	0,397	0,401	0,399	0,407	0,419	0,403	N
	víno	0,405	0,41	0,428	0,436	0,431	0,454	0,456	0,461
	víno + SD	0,407	0,41	0,431	0,458	0,437	0,453	0,459	0,459
Resveratrol	25%	0,387	0,426	0,463	0,475	0,474	0,565	0,647	0,675
	30%	0,386	0,442	0,524	0,578	0,648	0,829	0,89	0,936
	35%	0,406	0,548	0,763	0,831	0,911	1,025	1,084	1,124

Zdroj: autor, N – neměřeno

V obou případech nebylo zjištěno významné ovlivnění nárůstu mikroorganismů vlivem přídatku glukosy do média. Během kultivace se projevilo zpětné vyražení resveratrolu, proto byla přidána další rozpouštědla na zvýšení jeho rozpustnosti.

5.2. Možnosti zvýšení rozpustnosti resveratrolu

V předchozím testu kultivace kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (tabulka 6) i bakterií *Acetobacter oeni* (tabulka 7) se vyskytl zákal způsobený vysráženým resveratrolem. Proto se přistoupilo k sérii pokusů o zvýšení rozpustnosti resveratrolu ve víně a vinných mošttech.

Pokusy s rozpouštěním požadovaných koncentrací samotného resveratrolu ve víně a moštu byly neúspěšné. Ve vzorku vína byl patrný náznak rozpouštění, v moštu nikoli. Pravděpodobně je to způsobeno obsahem alkoholu ve víně. Po skončení míchání byly vzorky uloženy v lednici, kde se po 24 hodinách opět veškerý resveratrol vysrážel a usadil na dně.

Bylo vyzkoušeno několik různých rozpouštědel (ethanol, DMSO, Tween 80 %, PEG), avšak vždy po přidání rozpuštěného resveratrolu do vína či moštu došlo k jeho opětovnému vysrážení.

Tab. 8 Zkouška rozpustnosti resveratrolu v různých médiích

rsv c 850 $\mu\text{l/ml}$	2225 μl moštu +250 μl (rsv rozpuštěn 1:1 v ethanolu :PEG)+25 μl inokula	Po delší době vysrážení
rsv c 1000 $\mu\text{l/ml}$	2225 μl moštu +250 μl (rsv rozpuštěn 1:1 v ethanolu :PEG)+25 μl inokula	Nejde rozpustit, zahřívání na 80 °C, po chvilce stání vysrážení
rsv c 900 $\mu\text{l/ml}$	2225 μl moštu +250 μl (rsv rozpuštěn 1:2 v PEG:EtOH)+25 μl inokula	Po delší době vysrážení
rsv c 900 $\mu\text{l/ml}$	2225 μl moštu +250 μl (rsv rozpuštěn 1:1,5 v PEG:EtOH)+25 μl inokula	Nejde rozpustit
rsv c 600 $\mu\text{l/ml}$	2225 μl moštu +250 μl (rsv rozpuštěn EtOH)+25 μl inokula	Zahřívání na 80 °C, viditelný zákal

Zdroj: autor

Ani při pokusech se změnou pH moštu nebyl prokázán vliv acidity na rozpustnost resveratrolu. Přechodného rozpuštění bylo dosaženo zahříváním média na 80 °C ovšem po zchladnutí se resveratrol opět vysrážel.

Dále bylo zkoušeno vytvoření komplexu resveratrolu s cyklodextrinem, který lze použít ke zvýšení rozpustnosti nepolárních sloučenin ve vodě. Vzhledem k nerozpustnosti komplexu v bujonech a ethanolu bylo dále zkoušeno rozpustit komplex v DMSO. Prostřednictvím HPLC analýzy bylo určeno množství resveratrolu v komplexu a podle toho byla přepočtena požadovaná koncentrace. Po kultivaci byla měřena optická densita přístrojem TECAN Infinite M200 při 405 nm, pro měření při použití obarvení pomocí Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide byla vlnová délka zvýšena na 570 nm do oblasti absorpce barviva. Výsledky zobrazují tabulky 9 a 10.

Tab. 9 Nárůst *Acetobacter oeni* v médiu s přidavkem 25 % bujonu SD, rozpustnost resveratrolu v ethanolu a v DMSO

Přídavek SD 25 %	Datum měření					
	17.3.	18.3.	19.3.	24.3.	25.3.	30.3.
A. oeni 25 %	0,399	0,412	0,427	0,548	0,59	0,78
A. oeni 25 %	0,418	0,438	0,442	0,62	0,604	0,751
A. oeni 25 %	0,401	0,423	0,43	0,553	0,565	0,684
RSV in EtOH	0,384	0,418	0,434	0,602	0,626	0,774
RSV in EtOH	0,421	0,433	0,453	0,601	0,627	0,783
RSV in EtOH	0,391	0,423	0,44	0,606	0,637	0,78
RSV in DMSO	0,396	0,441	0,458	0,494	0,494	0,529
RSV in DMSO	0,403	0,625	0,633	0,709	0,695	0,804
RSV in DMSO	0,399	0,491	0,518	0,613	0,59	0,747
Kontrola čistoty (víno)	0,43	0,423	0,435	0,469	0,468	0,483
Kontrola růstu	0,366	0,389	0,463	0,652	0,701	0,826

Zdroj: autor

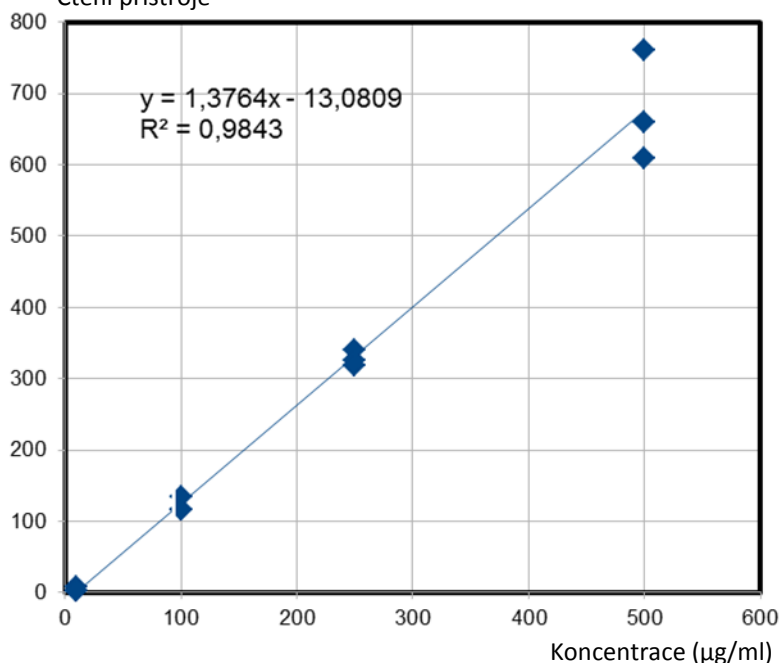
Tab. 10 Nárůst *Acetobacter oeni* v médiu s přidavkem 30 % bujonu SD, rozpustnost resveratrolu v ethanolu a v DMSO

Přídavek SD 30 %	Datum měření					
	9.3.	10.3.	11.3.	13.3.	16.3.	30.3.
A. oeni 30 %	0,398	0,408	0,443	0,619	0,763	0,923
A. oeni 30 %	0,404	0,415	0,439	0,607	0,73	0,86
A. oeni 30 %	0,401	0,413	0,45	0,593	0,785	0,883
RSV in EtOH	0,394	0,45	0,461	0,59	0,797	0,974
RSV in EtOH	0,396	0,42	0,44	0,527	0,769	1,025
RSV in EtOH	0,398	0,425	0,44	0,555	0,761	1,082
RSV in DMSO	0,395	0,402	0,506	0,625	0,942	1,161
RSV in DMSO	0,393	0,406	0,477	0,603	0,945	1,179
RSV in DMSO	0,392	0,405	0,457	0,583	0,922	1,112
Kontrola čistoty (víno)	0,416	0,38	0,424	0,421	0,442	0,498
Kontrola čistoty (bujon)	0,377	0,421	0,391	0,379	0,388	0,407
Kontrola růstu	0,39	0,407	0,475	0,606	0,726	0,847

Zdroj: autor

Pokus o vyřešení problému rozpustnosti pomocí inkluzního komplexu s cyklodextrinem selhal stejně. Rozpustnost nebyla významně zlepšena, i když koncentrace resveratrolu v komplexu měřená pomocí HPLC a kvantifikována pomocí lineární kalibrační křivky (obr. 7), byla stanovena na 35,12 ug / ml komplexu.

Obr. 7 Kalibrační křivka HPLC stanovení obsahu resveratrolu v komplexu
Čtení přístroje



Zdroj: autor

5.3. Stanovení MIC vybraných kmenů *Staphylococcus aureus*

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) bakterií *Staphylococcus aureus* byla počítána jako nejnižší koncentrace resveratrolu, která inhibuje ≥ 80 % bakteriálního nárůstu v porovnání se sloupcem kontroly růstu.

Byla stanovena mikrodiluční bujónovou metodou za použití MH bujónu, resveratrol rozpuštěn v DMSO. Výsledná MIC byla počítána v µg/ml.

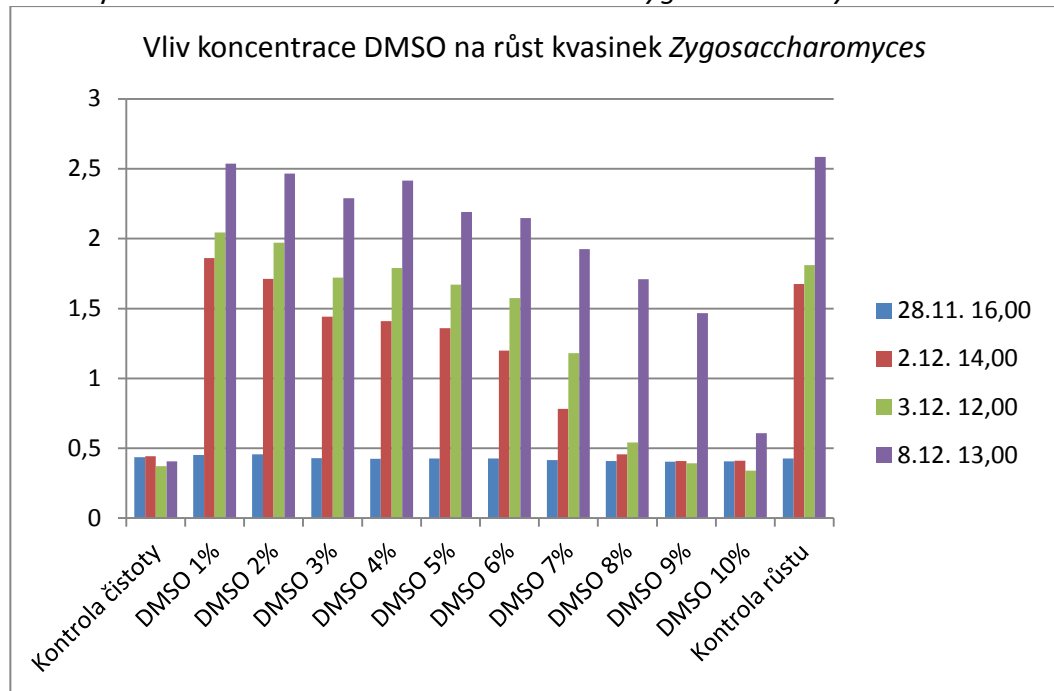
Tab. 11 Stanovení minimální inhibiční koncentrace vybraných kmenů *Staphylococcus aureus*

Opakování	Číslo kmenu							
	25923	29213	43300	33591	33592	BAA976	KI 1	KI 2
1.	512	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
2.	256	256	512	512	256	>1024	512	>1024
3.	256	256	256	256	256	512	256	512
Výsledná MIC	256	256	512	512	256	>1024	512	>1024

Zdroj: autor

Rovněž bylo posuzováno možné ovlivnění růstu kvasinek samotným DMSO, a pokud je možné ho přidávat k podpoře rozpustnosti ve vyšším než, v mikrobiologii běžně užívaném, obsahu 1 %. Během kultivace v termostatu při 25 °C byla průběžně měřena optická densita přístrojem Helios Epsilon při vlnové délce 405 nm.

Obr. 8 Graf vyhodnocení vlivu DMSO na růst kvasinek *Zygosaccharomyces rouxii*



Zdroj: autor

Výsledky testu nepotvrzují pozitivní vliv přidání DMSO do média k podpoře růstu kvasinek *Zygosaccharomyces rouxii*.

6. Diskuse

Pro demonstraci kvasinek způsobujících kažení vína byla dle rešerše vybrána *Saccharomyces cerevisiae* kultivovaná na bujonu SD. MRS bujon byl navrhován jako nejvhodnější médium pro růst bakterií. Jeho tmavá barva však neumožňovala měření optické density, potřebné pro stanovení všech testů. Byly k němu proto přidány další bujony a vytvořena směsná média. Pro praktické pokusy bylo posuzováno pět druhů bakterií na těchto typech kultivačních bujonů. Nejlepší nárůst na všech půdách projevoval *Acetobacter oeni*, se kterým se dále pracovalo.

Pro podporu růstu mikroorganismů v médiu byla do pokusného zaočkovaného vína přidávána glukóza v koncentrační řadě od 16 do 128 mg/ml. V porovnání s kultivací v čistém víně bylo zjištěno, že přídavek glukózy do zkoušeného moštu či vína neprojevovali účinek na jejich nárůst.

Následně bylo diskutováno přidání bujonu SD. Do vzorků vína byl proto přidán SD bujon v postupném obsahu 10 – 90 % objemu celkového roztoku. Po kultivaci byl zjištěn optimální přídavek glukózy do média, který je pro každý druh specifický. Z této škály byl v pokusu vybrán optimální přídavek pro bakterie *Acetobacter oeni* v množství 20 – 30 % a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* 15 – 25 % bujonu SD.

Po úpravách média se přistoupilo k přidávání resveratrolu. Jedná se o ve vodě špatně rozpustnou látku. Samotný se ani ve víně s obsahem bujonu nerozpouštěl. Byl posuzován i ve vzorcích čistého vína a moštu. Ve vzorku vína byl patrný náznak rozpouštění, v moštu nikoli. V obou případech se ale vysrážel a usadil na dně. Náznak rozpustnosti ve vínu je možný vysvětlit přítomností ethanolu, jež se v jiných studiích s resveratolem¹⁵ používá jako rozpouštědlo, patrně ale nebyla hladina ethanolu dostatečně vysoká k udržení resveratrolu v rozpouštěném stavu.

Byly provedeny pokusy s ovlivněním pH moštu, nebyl však prokázán vliv acidity na rozpustnost resveratrolu. Přechodného rozpouštění se dosáhlo zahříváním média na 80 °C ovšem po zchladnutí se resveratrol opět vysrážel.

Což je v rozporu s výsledky studie vedené Kolouchovou-Hanzlíkovou (2004) kde byl resveratrol rozpouštěn v čistém ethanolu na koncentraci 1 mg/l. Takto vzniklý roztok byl následně rozředěn na pracovní koncentrace a měřen HPLC v porovnání s ethanolovými roztoky z vyluhovaných částí rostliny vinné révy. Také Filip et al. (2003) dokazují, že přidání více než 20 % ethanolu do vodného roztoku podporuje rozpustnost resveratrolu, poukázal ale na to, že méně než 10 % ethanolu rozpustnost neovlivňuje. Také potvrdil, že rozpustnost

¹⁵ (Kolouchová-Hanzlíková et al, 2004), (Filip et al, 2003), (Fabbrocini et al, 2011), (Chan et al, 2000)

není ovlivněna teplotou. Rovněž v další studii (Fabbrocini et al, 2011) byl resveratrol úspěšně rozpuštěn v deionizované vodě a následně vyextrahován z gelu o teplotě 4 °C za použití čistého (99 %) ethanolu. Další studie (Chan et al, 2000) poukazuje na synergický efekt resveratrolu v přítomnosti ethanolu na potlačení tvorby oxidu dusnatého (NO) makrofágy. Zde byly také použity zředěné roztoky alkoholu, které byly smíchány s médiem buněčných kultur.

Ve výše zmíněných pokusech se pracovalo pouze s čistým ethanolem, nebo jeho vodným roztokem, zatímco v našem případě byl resveratrol ve směsi s ethanolem přidáván do neupraveného vzorku vína a moštu.

V další sérii testů bylo použito rozpouštědlo DMSO s ethanolem, nepodařilo se však zabránit opětovnému srážení ani po přidání podpůrných rozpouštědel Tween a PEG. Jak ukazuje tabulka 8, nepomohlo ani užití směsi ethanolu s PEG.

Pro další postup bylo zvoleno vytvoření cyklodextrinového komplexu, kde byl resveratrol s ethanolem v poměru 1 : 1 navázán na oligosacharid cyklodextrin, běžně používaný molekulový přenašeč v chemickém a potravinářském průmyslu. Přesný obsah resveratrolu v komplexu byl stanoven vysokotlakou kapalinovou chromatografií (HPLC) na 35,12 ug / ml. Rozpustnost však ani poté nebyla významně zlepšena.

V porovnání se studii ostatních autorů vyplývá, že nejlépe se resveratrol rozpouští v čistém ethanolu, nebo DMSO. Při naší studii byla koncentrace ovlivněna přidáním zkoušeného vína a moštu, v následném roztoku se nám nepodařilo udržet dostatečně vysokou hladinu ethanolu.

Při stanovení minimální inhibiční koncentrace bylo použito i rozpouštědlo DMSO. Nejdříve byl testován jeho možný vliv na podporu růstu mikroorganismů, jež by mohl zkreslit stanovení inhibičního účinku. Jeho vliv na nárůst mikroorganismů v samostatném pokusu s kvasinkami *Zygosaccharomyces rouxii* ale nebyl projeven. Dle obrázku 8 jeho vyšší koncentrace spíše brzdily růst těchto kvasinek.

DMSO je ale podle ostatních studií považováno za vhodné rozpouštědlo pro resveratrol, například podle Chana (2002) v pokusech inhibujících *Staphylococcus aureus* byla stanovena minimální inhibiční koncentrace 171 µl/ml resveratrolu s 1,7 % přídatkem DMSO, jež inhiboval 80 – 90 % růstu bakterie i *P. aeruginosa* byla inhibována 342 µl/ml resveratolem za přidaných 3,3 % DMSO. Samotné rozpouštědlo dle Chana nepůsobilo na zkoušené mikroorganismy podpůrným ani inhibičním účinkem. Podle jeho výsledků také přítomnost DMSO v kultivačním médiu inhibovala růst dermatofytů, již 1 – 5 % obsah rozpouštědla způsobila 20 – 50 % inhibici použitých druhů mikroorganismů. Také Pastorková

a kol. (2013) rozpouští resveratrol přímo v DMSO a následně přidává kultury bakterií pěstované na SD agaru s upraveným pH na hodnotu 3,5.

Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) bylo prováděno mikrodiluční bujonovou metodou na bakterii *Staphylococcus aureus*, která jako běžný mikroorganismus vyskytující se na lidské kůži způsobuje kontaminaci v mnoha odvětvích potravinářského průmyslu. MIC byla počítána jako nejnižší koncentrace resveratrolu, která inhibuje ≥ 80 % bakteriálního nárůstu v porovnání se sloupcem kontroly růstu obsahující zaočkované médium bujonu MH.

Výsledky ukazují jako nejcitlivější standartní kmeny ATCC 25923 a ATCC 29213 a ATCC 33592, které byly inhibovány již koncentrací 256 $\mu\text{l/ml}$. Druhá nejnižší inhibiční koncentrace resveratrolu 512 $\mu\text{l/ml}$ inhibovala růst ATCC 43300 a ATCC 33591 společně s klinickým izolátem 1 z Pražské nemocnice Motol. Jako nejodolnější kmeny se projeví ATCC BAA976 spolu s klinickým izolátem 2, kterých se nárůst nezastavil ani při překročení koncentrace 1024 μl resveratrolu v 1 ml bujonu MH.

Získané hladiny MIC jsou ve shodě s Pastorkovou a kol. (2013), kde byla MIC resveratrolu proti kvasinkám a octovým bakteriím stanovena v rozmezí 256 – 512 $\mu\text{g/ml}$. V jiných testech se inhibiční účinek resveratrolu objevil i proti dalším organismům (*Helicobacter pylori* při koncentraci 400 $\mu\text{l/ml}$ (Paulo et al, 2011)). Je také prokázán inhibiční účinek proti vzniku bakteriálních biofilmů, jak dokazuje studie (Coenye et al, 2012), ve které resveratrol dokázal potlačit růst *Propionibacterium acnes* již v subkoncentraci 0,32 % vodného roztoku.

Kvůli finanční a časové náročnosti přípravy stanovení MIC byl pokus proveden bez opakování, výsledky však ukazují inhibiční účinek resveratrolu na bakterii *Staphylococcus aureus*. Další výzkum proto pokračuje na Fakultě tropického zemědělství.

7. Závěr

Kontaminace vína byla demonstrována kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*, dále byly použity bakterie *Acetobacter oeni* stanovené z pokusu na několika druzích bakterií v kultivaci na více typech živného média.

Pro podporu růstu bakterií byla přidávána glukosa, která neprojevila pozitivní dopad na jejich růst. Lepších výsledků se dosáhlo přidáním bujONU SD. Jako optimální přídavek bylo určeno 20 – 30 % pro bakterie *Acetobacter oeni* a 15 – 25 % přidaného bujONU pro kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.

Samotný resveratrol se nerozpouštěl v moštu ani ve víně a nepomohlo ani přidání ethanolu jako rozpouštědla. Přidání dalších rozpouštědel (Tween 80 %, PEG) se rovněž ukázalo, jako neúčinné. Zkoušena byla i rozpustnost v komplexu s cyklodextrinem. Tímto způsobem ovšem také nebylo dosaženo významného zlepšení.

Po sérii neúspěšných pokusů o rozpuštění v ethanolu bylo nakonec použito rozpouštědlo DMSO. To jako samotné neprokázalo zkreslující vliv na růst mikroorganismů, a proto bylo dále používáno pro stanovení MIC.

Stanovení MIC bylo provedeno mikrodiluční bujónovou zkouškou. Kvůli finanční a časové náročnosti přípravy byl pokus proveden bez opakování, výsledky však ukazují inhibiční účinek resveratrolu na bakterii *Staphylococcus aureus*.

Nadále pokračují práce na optimalizaci vlastností inkluzivního komplexu resveratrolu s cyklodextrinem. Další výzkum proto pokračuje na Fakultě tropického zemědělství a bude předmětem budoucích doktorandských prací. Závěrem lze konstatovat, že přes veškeré vzniklé komplikace se resveratrol stále jeví jako perspektivní alternativní konzervant.

8. Seznam literatury

- Aggarwal, B. B., Bhardawaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., Takada, Y. 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*. 24 (5A). ISBN: 2783-2840
- Association de la Sommellerie Internationale. 2001. Sommelier, povolání budoucnosti: postupy pro profesionální sommeliery. Asociace sommeliérů ČR. Praha. 111 s. str. 36-37. ISBN: 80-903019-1-6
- Bae, S., Fleet, G. H., Heard, G. M. 2004. Occurrence and significance of *Bacillus thuringiensis* on wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*. 94 (3). p. 301–312. ISSN: 0168-1605
- Bhandari B. R., D'arcy, B. R., Bich, L. L. T. 1998. Lemon oil to β -cyclodextrin ratio effect on the inclusion efficiency of β -cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46 (4). p. 1494-1499. ISSN: 0021-8561
- Bulit, J., Lafon, R. 1970. Quelques aspects de la Biologie du Botrytis cinerea Pers. agent de la pourriture grise des raisins. *Connaissance de la Vigne et du Vin*. 4. p. 159–174. ISSN: 0010-597X
- Burda, Alexandr. 2013. O Vině. Carter/reproplus s r.o. Praha. 107 s. ISBN: 978-80-87613-01-6
- Castellucci, F. 2004. RESOLUTION OENO 19/2004 . Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. Office international de la vigne et du vin. 19. Annex C
- Ciani, M., Fatichenti. F. 1999. Selective sugar consumption by apiculate yeasts. *Letters in Applied Microbiology*. 28 (3). p. 203–206. ISSN: 1472-765X
- Coenye, T., Brackman, G., Rigole, P., De Witte, E., Honraet, K., Rossel, B., Nelis, H. J. 2012. Eradication of *Propionibacterium acnes* biofilms by plant extracts and putative identification of icariin, resveratrol and salidroside as active compounds. *Phytomedicine*. 19 (5). p. 409– 412. ISSN: 0944-7113
- Deak, T., Beuchat, L. R. 1996. Handbook of Food Spoilage Yeasts. CRC Press LLC. New York. 224 p. ISBN: 0-8493-2703-2
- Dicks, L. M. T., van Vuuren, H. J. J. 1988. Identification and physiological characteristics of heterofermentative strains of *Lactobacillus* from South African red wines. *Journal of Applied Bacteriology*. 64 (6). p. 505–513. ISSN: 1365-2672

- Donèche, B. J. 1993. Botrytized wines. In: Fleet, G. H. (ed.) Wine Microbiology and Biotechnology. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. Chapter 11. p. 327–351. ISBN: 0-415-27850-3
- Dupin, H. 1981. Apports nutritionnels conseillés pour la population française. Commission CNRS/CNERNA. Tec et Doc. Lavoisier. Paris. ISBN: 2-85206-116-3
- Dupin, H., Abraham, J., Giachetti, I. 1992. Apports nutritionnels conseillés pour la population française (2. vydání). Commission CNRS/CNERNA. Tec et Doc. Lavoisier. Paris. ISBN: 2-85206-727-7
- Edwards, C. G., Powers, J. R., Jensen, K. A., Weller, K. M., Peterson, J. C. 1993. Lactobacillus spp. from Washington State wines: isolation and characterization. Journal of Food Science. 58 (2). p. 453–458. ISSN: 1750-3841
- Edwards, C. G., Haag, K. M., Collins, M. D. 1998a. Identification and Characterization of Two Lactic Acid Bacteria Associated With Sluggish/Stuck Fermentations. American Journal of Enology and Viticulture. 49 (4). p. 445–448. ISSN: 0002-9254
- Edwards, C. G., Haag, K. M., Collins, M. D., Hutson, R., Huang, Y. C. 1998b. Lactobacillus kunkeei sp. nov.: a spoilage organism associated with grape juice fermentations. Journal of Applied Microbiology. 84 (5). p. 698–702. ISSN: 1365-2672
- Fabbrocini, G., Staibano, S., De Rosa, G., Battimiello, V., Fardella, N., Iardi, G., La Rotonda, M. I., Longobardi, A., Mazzella, M., Siano, M., Pastore, F., De Vita, V., Vecchione, M. L., Ayala, F. 2011. Resveratrol-Containing Gel for the Treatment of Acne Vulgaris. American Journal of Clinical Dermatology. 12 (2). p. 133-141. ISSN: 1175-0561
- Filip, V., Plocková, M., Šmidrkal, J., Špičková, Z., Melzoch, K., Schmidt, Š. 2003. Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. Food Chemistry 83 (4). p. 585-593. ISSN: 0308-8146
- Fugelsang, K. C., Edwards, C. G. 2007. Wine microbiology. Practical Applications and Procedures. Springer. New York. 393 p. ISBN-13: 978-0-387-33341-0
- Garvie, E. I. 1986. Genus Pediococcus. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G. (eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Williams and Wilkins. Baltimore. MD. p. 1075–1079. ISBN: 978-0387-24145-6
- Gini, B. and R. H. Vaughn. 1962. Characteristics of some bacteria associated with the spoilage of California dessert wines. American Journal of Enology and Viticulture. 13 (1). p. 20–31. ISSN: 0002-9254

- González-Rompinelli, E. M., Rodríguez-Bencomo, J. J., García-Ruiz, A., Sánchez-Patán, F., Martín-Álvarez, P. J., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M. V. 2013. A winery-scale trial of the use of antimicrobial plant phenolic extracts as preservatives during wine ageing in barrels. *Food Control*. 33 (2). p. 440-447. ISSN: 0956-7135
- Grassin, C; Dubourdieu, D. 1989. Quantitative determination of Botritis laccase in musts and wines by the syringaldazine test. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 48 (3). s. 369-376. ISSN: 1097-0010
- Chan, Marion Man-Ying. 2002. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochemical Pharmacology*. 63 (2). p. 99-104. ISSN: 0006-2952
- Chan, M. M.-Y., Mattiacci, J. A., Hwang, H. S., Shah, A., Fong D. 2000. Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Biochemical Pharmacology*. 60 (10). p. 1539-1548 ISSN: 0006-2952
- Kandler, O., Weiss, N. 1986. Genus *Lactobacillus*. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G. (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams and Wilkins. Baltimore. MD. p. 1209–1234. ISBN: 978-0387-24145-6
- Kolouchová-Hanzlíková, I., Melzoch, K., Filip, V., Šmidrkal, J. 2004. Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines. *Food Chemistry*. 87 (1). s. 151–158. ISSN: 0308-8146
- Kraus, V., Kopeček, J. 2002. *Setkání s vínem*. RADIX s r.o. Praha. 158 s. ISBN: 80-86031-36-5
- Kunkee, R. E. 1996. Several decades of wine microbiology: have we changed or have the microbes? In: *Proceedings of the Wine Spoilage Microbiology Conference*. California State University Fresno, CA. p. 44–49.
- Kurtzman, C. P. 1998. *Zygosaccharomyces* Barker. In: Kurtzman, C. P., Fell, J. W. (Eds.) *The Yeasts - A Taxonomic Study*, Fourth Edition. Elsevier. New York. Chapter 57. p. 424–432. ISBN: 978-0-444-81312-1
- Lastra, Alarco' n de la., Villegas, I. 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*. 35 (5). ISBN: 1156-1160.
- Malík, Fedor. 2003. *Ze života vína*. Filip Trend Publishing. Pardubice. 221 s. str. 127–133. ISBN: 80-86282-27-9

- Martin, A. 2001. Apports nutritionnels conseillés pour la population française (3. vydání). Comission CNRS/CNERNA. Tec et Doc. Lavoisier. Paris. ISBN: 2-7430-0422-3
- Mendel, Miloš. 2010. Víno a vinařství v dějinách islámu. Orientální ústav Akademie Věd České Republiky, v. v. i. Praha. 494 s. ISBN: 978-80-85425-64-2
- Meyer, S. A., Payne, R. W., Yarrow, D. 1998. *Candida* Berkhout. In: Kurtzman, C. P., Fell, J. W. (Eds.) *The Yeasts - A Taxonomic Study, Fourth Edition*. Elsevier. New York. Chapter 64. p. 454–573. ISBN: 978-0-444-81312-1
- Michlovský, Miloš. 2012. Oxid siřičitý v enologii. Vinselekt Michlovský a.s. Rakvice. 151 s. ISBN: 978-80-905319-0-1
- Michlovský, Miloš. 2014a. Lexikon chemického složení vína. Vinselekt Michlovský a.s. Rakvice. 262 s. ISBN: 978-80-905319-2-5
- Michlovský, Miloš. 2014b. Příprava bílých vín. Vinselekt Michlovský a.s. Rakvice. 289 s. ISBN: 978-80-905319-4-9
- Minussi, R. C; Pastore, G. M; Durán, N. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*. 13 (6-7) s. 205–216, ISSN: 0924-2244
- Murrell, W. G., Rankine, B. C. 1979. Isolation and identification of a sporing *Bacillus* from bottled brandy. *American Journal of Enology and Viticulture*. 30 (3). p. 247–249
ISSN: 0002-9254
- Nařízení Komise (ES) č. 606/2009, kterým se stanoví některá prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 479/2008, pokud jde o druhy výrobků z révy vinné, enologické postupy a omezení, která se na ně použijí.
- Pallman, C. L., Brown, J. A., Olineka, T. L., Cocolin, L., Mills, D. A., Bisson, L. F. 2001. Use of WL medium to profile native flora fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*. 52 (3). p. 198–203. ISSN: 0002-9254
- Pastorková, E., Žáková, T., Landa, P., Nováková, J., Vadlejch, J., Kokoška, L. 2013. Growth inhibitory effect of grape phenolics against wine spoilage yeasts and acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 161 (3). p. 209-213.
ISSN: 0168-1605
- Pátek, Jaroslav. 1998. Zrození vína. BOOKS. Brno. 248 s. ISBN: 80-7242-039-9
- Paulo, L., Oleastro, M., Gallardo, E., Queiroz, J. A., Domingues, F. 2011. Antimicrobial properties of resveratrol: a review. In: Méndez-Vilas, A. (ed.). *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. MICROBIOLOGY BOOK SERIES - Number 3. Vol 2. FORMATEX. Badajoz. Spain. p. 1225-1235. ISBN: 978-84-939843-2-8

- Pilone, G. J., Clayton, M. G., van Duivenboden, R. J. 1991. Characterization of wine lactic acid bacteria: single broth culture for tests of heterofermentation, mannitol from fructose and ammonia from arginine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 42 (2). p. 153–157. ISSN: 0002-9254
- Prováděcí nařízení komise (EU) č. 203/2012 ze dne 8. března 2012, kterým se mění nařízení (ES) č. 889/2008, kterým se stanoví prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 834/2007, pokud jde o prováděcí pravidla pro ekologickou produkci vína
- Seldon, Philip. 1996. *Vína*. PRAGMA. Praha. 364 s. ISBN: 80-7205-815-0
- Silva L. R., Cleenwerck I., Rivas R., Swings J., 2006. *Acetobacter oeni* sp. nov., isolated from spoiled red wine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56 (1). p. 21-24. ISSN: 1466-5026
- Silvano, S., Dumont, A., Didier, T., Blasquez, C., Raynal, C., Ortiz-Julien, A. 2013. Maîtriser la biodiversité microbienne du vin pour une meilleure expression des arômes. *Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologiques*. 40 (149S). p. 21-25. ISSN: 0760-9868
- Shimazu, Y; Watanabe, M. 1981. Effects of yeast strains and environmental conditions on formation of organic acids in must during fermentation. *Journal of Fermentation Technology*. 59. 27–32. ISSN: 0385-6380
- Schwalbe, R., Steele-Moore, L., Goodwin, A. C. 2007. *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. p. 414. ISBN: 0-8247-4100-5.
- Sponholz, W. R. 1993. Wine spoilage by microorganisms. In: Fleet, G. H. (ed.). *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers. Chur. Switzerland. Chapter 14. p. 395–420. ISBN: 978-041527850
- Sponholz, W. R., Dittrich. H. H. 1985. Über die Herkunft von Gluconsäure, 2- und 5-oxo Gluconsäure sowie Glucuron- und Galacturonsäure in Mosten und Weinen. *VITIS - Journal of Grapevine Research*. 24. p. 51–58.
- Steidl, R. 2010. *Sklepní hospodářství*. Národní vinařské centrum. Valtice. 309 s. ISBN: 978-80-903201-9-2
- Taillandier, P., Bonnet, J. 2005. *Le vin. Composition et transformations chimiques*. Lavoisier. Paris. 204 p. ISBN: 2-7430-0804-0
- Thomas, D. S., Davenport, R. R. 1985. *Zygosaccharomyces bailii* - a profile of characteristics and spoilage activities. *Food Microbiology*. 2 (2). p. 157–169. ISSN: 0740-0020

Weiss, N. 1992. The genera *Pediococcus* and *Aerococcus*. In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (eds.). *The Prokaryotes*. 2nd edition. Springer-Verlag. New York. NY. Volume 2. Chapter 68. p. 1502–1507.
ISBN 978-1-4757-2193-5

9. Seznam příloh

Příloha 1 Obsah hlavních alkoholů ve víně, 68

Příloha 2 Inhibiční koncentrace látek pro *Zygosaccharomyces*, 68

Příloha 3 Vybrané druhy *Lactobacillus* a jejich charakteristika, 69

Příloha 4 Vybrané druhy *Pediococcus* a jejich charakteristika, 69

Příloha 5 Obsah vitaminů ve víně a moštu a jejich doporučené denní dávky, 70

Příloha 6 Koncentrační řada glukosy, 71

Příloha 7 MIC nakultivovaná destička před obarvením, 72

Příloha 8 MIC detail nakultivované destičky před obarvením, 72

Příloha 9 MIC detail nakultivované destičky po obarvení, 73

10. Přílohy

Příloha 1 Obsah hlavních alkoholů ve víně

Alkohol	Vzorec	Průměrný obsah v g/l
Metanol	CH ₃ OH	0,015 až 0,30
Etanol	CH ₃ -CH ₂ OH	60 až 150
Propan-1-ol	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ OH	0,03
2-metyl propan-1-ol	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagdown \\ \text{CH} - \text{CH}_2\text{OH} \\ \diagup \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	0,08
3-metyl butan-1-ol	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagdown \\ \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{OH} \\ \diagup \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	0,4
2-metyl butan-1-ol	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagdown \\ \text{CH} - \text{CH}_2\text{OH} \\ \diagup \\ \text{H}_3\text{C} - \text{CH}_2 \end{array}$	0,15

Zdroj: (Taillandier & Bonnet, 2010)

Příloha 2 Inhibiční koncentrace látek pro *Zygosaccharomyces*

Compound	Concentration
Acetic acid	>2.5% v/v
Benzoic acid	>1000 mg/L
Ethanol	>20% v/v
Inhibitory pH	<2 and >7
Sorbic acid	>800 mg/L
Sugar	>70% w/v
Sulfur dioxide	>3 mg/L molecular

Zdroj: (Thomas & Davenport, 1989)

Příloha 3 Vybrané druhy *Lactobacillus* a jejich charakteristika

Characteristic	<i>L. brevis</i>	<i>L. hilgardii</i>	<i>L. kunkeei</i>	<i>L. plantarum</i>
Ammonia from arginine	+	+	–	–
Catalase	v	+	w	v
Gas from glucose	+	+	+	–
Hydrolysis of esculin	v	–	–	+
Lactic acid from glucose	DL	DL	L	DL
Mannitol from fructose	+	+	+	–
Fermentation of:				
Arabinose	+	–	–	v
Fructose	+	+	+	+
Lactose	v	v	–	+
Mannitol	–	–	+	+
Maltose	+	+	–	+
Melezitose	–	v	–	+
Ribose	+	+	–	+
Sucrose	v	v	+	+
Trehalose	–	–	–	+
Xylose	v	+	–	v

(+) 90% or more of the strains are positive; (–) 90% or more of the strains are negative; (v) variable response of strains; (w) weak reaction.

Zdroj: (Kandler & Weiss, 1986), (Dicks & van Vuuren, 1988), (Pilone et al, 1991), (Edwards et al, 1993), (Edwards et al, 1998a), (Edwards et al, 1998b), upravil: (Fugelsang & Edwards, 2007)

Příloha 4 Vybrané druhy *Pediococcus* a jejich charakteristika

Characteristic	<i>P. damnosus</i>	<i>P. parvulus</i>	<i>P. pentosaceus</i>
Ammonia from arginine	–	–	+
Catalase	–	–	v
Gas from glucose	–	–	–
Hydrolysis of esculin	+	+	+
Lactic acid from glucose	DL	DL	DL
Mannitol from fructose	–	–	–
Fermentation of:			
Arabinose	–	–	+
Fructose	+	+	+
Lactose	–	–	v
Mannitol	–	–	–
Maltose	v	+	+
Melezitose	v	–	–
Ribose	–	–	+
Sucrose	v	–	–
Trehalose	+	v	+
Xylose	–	–	v

(+) 90% or more of the strains are positive; (–) 90% or more of the strains are negative; (v) variable response of strains.

Zdroj: (Garvie, 1986), (Pilone et al, 1991), (Weiss, 1992), upravil: (Fugelsang & Edwards, 2007)

Příloha 5 Obsah vitaminů ve víně a moštu a jejich doporučené denní dávky

Vitamin	Mošt µg/l	Víno µg/l	Doporučená dávka mg/den		
			Muž	Žena	Těhotná žena
B ₁ – Tiamin	500	stopy až 60	1,3	1,1	1,8
B ₂ - Riboflavin	do 100	stopy až 100	1,6	1,5	1,6
B ₃ - Niacin	3.000	1.000 - 2.000	14	11	16
B ₅ – Kyselina pantothenová	1.000	1.000	5	5	5
B ₆ - Pyridoxin	500	600 až 700	1,8	1,6	2
B ₇ – Biotin (H)	5	2 až 5	0,05		
B ₉ – Kyselina listová	2	2 až 10	0,33	0,3	0,4
B ₁₂ - Kobalamin	stopy	0,1	2,4	2,4	2,6
C – Kyselina askorbová	50.000	1 až 10 x 10 ³	110	110	120

Zdroj: (Dupin, 1981), (Dupin et al, 1992), (Martin, 2001)

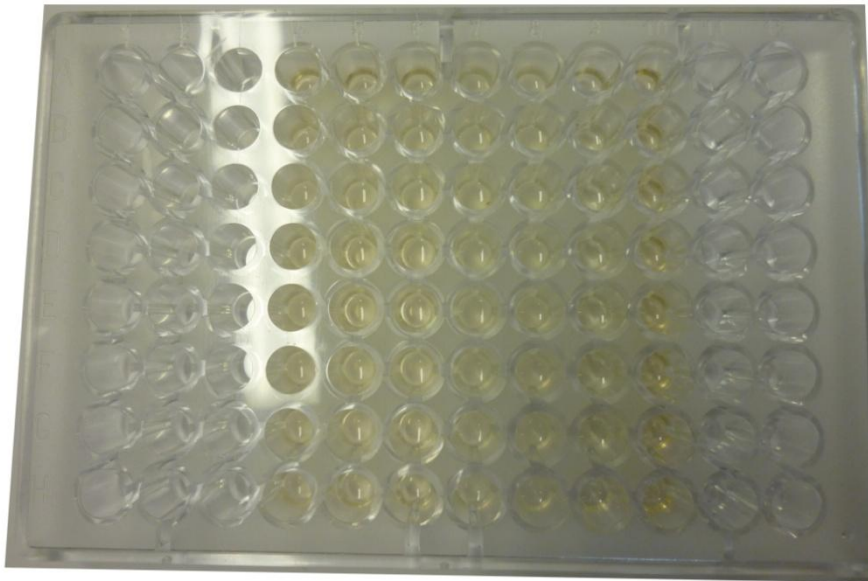
Příloha 6 Koncentrační řada glukosy

		13.2.	16.2.	19.2.	24.2.	
SC	128	0,422	0,469	0,466	0,494	25 µl inokula+ 2475 µl vína + glukosa
	64	0,459	0,493	0,517	0,506	
	32	0,443	0,483	0,491	0,524	
	16	0,45	0,497	0,491	0,53	
SC	128	0,401	0,472	0,448	0,0471	
	64	0,463	0,484	0,487	0,539	
	32	0,433	0,48	0,486	0,509	
	16	0,478	0,481	0,489	0,514	
	8	0,445	0,486	0,485	0,552	
	4	0,452	0,486	0,502	0,527	
	2	0,443	0,487	0,495	0,512	
AO	128	0,443	0,468	0,486	0,506	
	64	0,45	0,494	0,506	0,518	
	32	0,45	0,499	0,504	0,534	
	16	0,459	0,502	0,505	0,531	
	8	0,467	0,506	0,518	0,553	
	4	0,461	0,503	0,507	0,55	
	2	0,468	0,512	0,527	0,555	
AO	128	0,425	0,46	0,476	0,493	
	64	0,468	0,502	0,512	0,546	
	32	0,451	0,488	0,5	0,523	
	16	0,463	0,485	0,495	0,541	
1)čistota 128- do vína přidána glukosa, koncetrace 128 mg/ml		0,408	0,441	0,45	0,479	
2)čistota 128		0,395	0,443	0,452	0,479	
AO SD- zaočkované víno, inokulum připraveno v SD		0,453	0,504	0,511	0,527	25µl inokula+2475 µl vína
AO fýzák- zaočkované víno, inokulum připraveno ve fyziologickém roztoku		0,459	0,489	0,512	0,532	
SC SD- zaočkované víno, inokulum připraveno v SD		0,45	0,492	0,506	0,531	
SC fýzák- zaočkované víno, inokulum připraveno ve fyziologickém roztoku		0,444	0,484	0,489	0,532	
čistota 1- pouze víno		0,447	0,489	0,499	0,523	
čistota 2		0,44	0,483	0,492	0,53	

Zdroj: autor

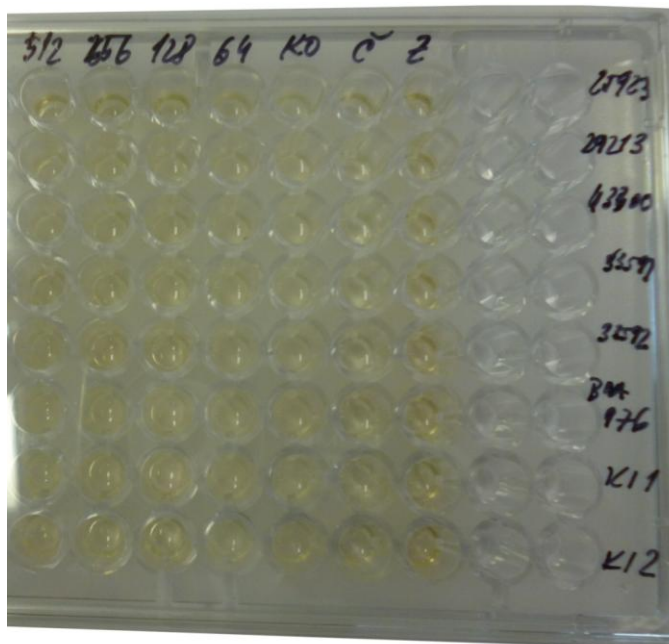
	SD- inokulum připraveno v SD bujonu
	fýzák- inokulum připraveno ve fyziologickém roztoku

Příloha 7 MIC nakultivovaná destička před obarvením



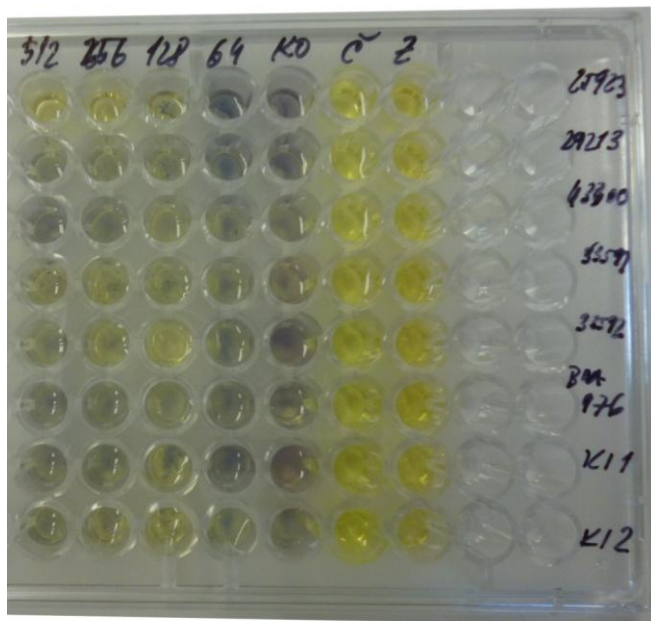
Zdroj: autor

Příloha 8 MIC detail nakultivované destičky před obarvením



Zdroj: autor

Příloha 9 MIC detail nakultivované destičky po obarvení



Zdroj: autor