

Mikroflóra vína v průběhu výroby

Nikola Honková

Bakalářská práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Nikola Honková**
Osobní číslo: **T12704**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin – specializace Technologie mléka a mléčných výrobků**
Forma studia: **kombinovaná**
Téma práce: **Mikroflóra vína v průběhu výroby**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Zpracujte rešerši na dané téma s využitím všech dostupných zdrojů.
2. Stručně zpracujte technologii výroby vína.
3. Popište mikroflóru vyskytující se na hroznech, v moštu a ve víně.
4. Zaměřte se na mikroflóru vína.

II. Praktická část

1. Provedte mikrobiologický rozbor vin v různých fázích výroby.
2. Výsledky vhodně vyhodnoťte.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

- [1] RIBÉREAU-GAYON, P. — BRANCO, J.M. Handbook of enology. : The microbiology of wine and vinifications. volume 1. Chichester, West Sussex, England. 2006. ISBN 97804700103651, 97804700103411. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/0470010363>.
- [2] STEIDL, Robert a RENNER, Wolfgang. Moderní příprava červeného vína. V českém jazyce vyd. 1. Valtice: Národní salon vín, 2003. 72 s. ISBN 80-903201-2-0.
- [3] STEIDL, R. -- RENNER, W. Problémy kvašení vín. 1. vyd. Valtice: Národní salon vín, 2004. 74 s. ISBN 80-903201-3-9.
- [4] EDER, R. a kol. Vady vína. 1. vyd. Valtice: Národní vinařské centrum, 2006. 263 s. ISBN 80-903201-6-3.
- [5] DELFINI, C. -- FORMICA, J.V. Wine microbiology : science and technology. New York: Marcel Dekker, 2001. 490 s. ISBN 0-8247-0590-4.
- [6] STEIDL, Robert. Sklepní hospodářství. V českém jazyce vyd. 2., aktualiz. Valtice: Národní vinařské centrum, 2010. 309 s. ISBN 978-80-903201-9-2.
- [7] STEIDL, Robert. Po cestách ke špičkovému vínu. V českém jazyce vyd. 1. Valtice: Národní vinařské centrum, 2010. 64 s. ISBN 978-80-903201-8-5.
- [8] PAVLOUŠEK, Pavel. Výroba vína u malovinářů. 2., aktualiz. a rozš. vyd. Praha: Grada, 2010. 120 s., [8] s. barev. obr. příl. ISBN 978-80-247-3487-3.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Zita Bastlová

Ústav technologie potravin

Datum zadání bakalářské práce:

2. února 2016

Termín odevzdání bakalářské práce:

4. května 2016

Ve Zlíně dne 2. února 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
vedoucí ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 2. 5. 2016

N. Honková

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jim dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá výskytem mikroorganismů v průběhu výroby vína. Teoretická část je zaměřena především na mikroflóru bobulí hroznu, moštu a vína. Dále je popsána stavba hroznu, bobule a výroba vína. V praktické části jsou popsány metody, které byly použity při mikrobiologickém rozboru bobulí hroznu, moštu a vína. Získané výsledky byly zpracovány do tabulek a grafů.

Klíčová slova: hrozen, mošt, víno, bakterie mléčného kvašení, octové bakterie, kvasinky, plísně, výroba vína

ABSTRACT

Bachelor thesis deals the occurrence of micro-organisms during the wine production. The theoretical part is mainly focused on the microflora of berries grape, grapes juice and wine. Further described is structure of grapes and berries and wine production. In the practical part is described the methods that were used in microbiological analysis of grape berries, grapes juice and wine. The obtained results were processed into tables and graphs.

Keywords: grape, grapes juice, wine, lactic acid bacteria, acetic bacteria, yeasts, fungi, wine production

Ráda bych poděkovala své vedoucí bakalářské práce paní Ing. Zitě Bastlové, DiS., za odborné vedení, vstřícnost a cenné rady. Dále děkuji SPŠM a VOŠP v Kroměříži za přístup do laboratoře, kde jsem si mohla provést rozbor a paní Ing. Zdeňce Foltýnové za pomoc v laboratoři.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 STAVBA HROZNU A BOBULE.....	12
2 MIKROFLÓRA BOBULÍ HROZNŮ, MOŠTU A VÍNA.....	14
2.1 BAKTERIE.....	16
2.1.1 Morfologie bakterií	16
2.1.2 Mléčné bakterie	17
2.1.2.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	17
2.1.2.2 Rod <i>Oenococcus</i>	18
2.1.2.3 Rod <i>Leuconostoc</i>	18
2.1.2.4 Rod <i>Pediococcus</i>	18
2.1.3 Octové bakterie	18
2.1.3.1 Rod <i>Acetobacter</i>	19
2.1.4 Změny zapříčiněné činností bakterií ve víně	19
2.2 KVASINKY A KVASINKOVÉ MIKROORGANISMY.....	20
2.2.1 Morfologie kvasinek a kvasinkových kolonií	20
2.2.2 Rozmnožování kvasinek	21
2.2.2.1 Vegetativní rozmnožování	21
2.2.2.2 Pohlavní rozmnožování	21
2.2.3 Kvasinková mikroflóra půdy.....	21
2.2.4 Kvasinková mikroflóra hroznů	22
2.2.5 Kvasinková mikroflóra moštu a její změny během kvašení	22
2.2.6 Kvasinková mikroflóra vína.....	23
2.2.7 Přehled nejdůležitějších vinných kvasinek	23
2.2.7.1 Rod <i>Hanseniaspora</i>	23
2.2.7.2 Rod <i>Issatchenkia</i>	23
2.2.7.3 Rod <i>Pichia</i>	23
2.2.7.4 Rod <i>Saccharomyces</i>	24
2.2.7.5 Rod <i>Schizosaccharomyces</i>	24
2.2.7.6 Rod <i>Hansenula</i>	24
2.2.7.7 Rod <i>Torulopsis</i>	25
2.2.7.8 Rod <i>Candida</i>	25
2.2.7.9 Rod <i>Kloeckera</i>	26
2.2.7.10 Rod <i>Rhodotorula</i>	26
2.3 PLÍSNĚ.....	26
2.3.1 Zygomycetes	26
2.3.1.1 Rod <i>Mucor</i>	26
2.3.1.2 Rod <i>Rhizopus</i>	26
2.3.2 Ascomycetes	27
2.3.2.1 Rod <i>Botrytis</i>	27
2.3.2.2 Rod <i>Cladosporium</i>	27
2.3.2.3 Rod <i>Aspergillus</i>	27
2.3.2.4 Rod <i>Penicillium</i>	28
3 VÝROBA VÍNA	29

3.1	SBĚR HROZNŮ.....	29
3.2	PŘÍJEM HROZNŮ.....	29
3.3	ODSTOPKOVÁNÍ A DRCENÍ HROZNŮ.....	29
3.4	LISOVÁNÍ HROZNŮ.....	30
3.5	NAKVAŠOVÁNÍ HROZNŮ.....	31
3.6	FERMENTACE.....	31
3.7	JABLEČNO-MLÉČNÁ FERMENTACE.....	32
3.8	ŠKOLENÍ VÍNA.....	32
3.8.1	Síření vína.....	32
3.8.2	Číření vína.....	32
3.8.3	Filtrace.....	33
3.8.4	Zrání vína.....	33
3.9	LAHVOVÁNÍ.....	33
II PRAKTICKÁ ČÁST.....		35
4	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR VZORKU.....	36
4.1	ODBĚR VZORKŮ.....	37
4.2	PŘEPRAVA A UCHOVÁNÍ VZORKŮ.....	37
4.3	ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ V LABORATOŘI.....	37
4.3.1	Otevírání obalů vzorků.....	37
4.3.2	Navážka.....	37
4.3.3	Ředění.....	37
4.3.3.1	Stupeň ředění.....	38
4.3.4	Očkování.....	38
4.3.5	Kultivace.....	39
4.3.6	Odečítání a hodnocení výsledků.....	39
4.3.6.1	Vzorce pro výpočet výsledků.....	39
5	STANOVENÍ CELKOVÉHO POČTU MIKROORGANISMŮ.....	42
6	STANOVENÍ PLÍSNÍ A KVASINEK.....	45
7	STANOVENÍ OCTOVÝCH BAKTERIÍ.....	49
8	STANOVENÍ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	52
ZÁVĚR.....		54
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		57
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....		60
SEZNAM OBRÁZKŮ.....		61
SEZNAM TABULEK.....		62
SEZNAM GRAFŮ.....		63
SEZNAM PŘÍLOH.....		64

ÚVOD

Víno je nápoj, který se mění do nekonečného množství variant v závislosti na poloze vinnice, klimatických podmínkách, technologii výroby, výrobcí i konzumentovi. Víno je jako živý organismus: zraje, dosahuje vrcholu zralosti a stárne.

Víno byl první alkoholický nápoj, který člověk sám poznal a také si ho dokázal sám vyrobit. Lidé pěstovali révu vinnou už od středověku.

Víno je odnepaměti prostředkem stimulačním, který zvyšuje emoce a schopnosti zážitku a dává přemýšlivým lidem možnost poznání vlivů různých přírodních podmínek na proměnlivost složitých vlastností přírodního nápoje vnímatého všemi smysly.

Víno však může být znehodnoceno různými vadami, chorobami a nedostatky, které jsou zapříčiněny mikrobiální kontaminací, nesprávným postupem výroby nebo špatnou surovinou.

Na kvalitu vína mají velký vliv klimatické a půdní podmínky, které jsou charakteristické pro různé vinařské oblasti [1].

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 STAVBA HROZNU A BOBULE

Plodem révy vinné je dužnatý plod – bobule, která se po úspěšném opylení a oplození vyvíjí z pletiv vajíčka. Květenství se přeměňuje na hrozen složený z bobulí. Hrozen se skládá ze stopky, třapiny a bobulí.

Tvar a charakter třapiny a počet bobulí v závislosti na velikosti hroznu určuje tvar hroznu a hustotu uspořádání bobulí. Na odrůdě a ekologických podmínkách závisí rozměr hroznu. Třapina vzniká změnou osy květenství a představuje asi 3-7 % z celkové hmotnosti hroznu. Obsahuje málo cukrů, průměrnou koncentraci kyselin, a to hlavně ve formě solí, a má vysoký obsah fenolických látek. Třapina představuje asi 20 % z celkového obsahu fenolických látek v hroznu.

Bobule se skládá ze skupiny pletiv tzv. oplodí, která obklopují semena. Oplodí se dělí na slupku, dužninu a pletivo ohraničující semena. Těsně pod slupkou, vně dužniny se rozvětvují vodivá pletiva.

Slupku tvoří kutikula, epidermis a hypodermis. Kutikula tvoří vrstvu na povrchu bobule a v závislosti na odrůdě může být různě silná. Začíná se vytvářet asi tři týdny po oplození vajíčka, ale v průběhu vývoje a hlavně při dozrávání bobulí se její síla snižuje. Na jejím povrchu se může vyskytovat voskovitý povlak. Slupku tvoří jedna nebo dvě vrstvy tangenciálně protažených buněk. V buňkách slupky je velmi nízká koncentrace cukru, obsah kyselin je vyšší. Obsahuje především kyselinu citronovou. Ve slupce bývá vyšší pH než v dužnině. Slupku charakterizuje především obsah sekundárních metabolitů – antokyanová barviva, taniny a aromatické látky.

Dužnina je tvořena z velkých mnohoúhelníkovitých buněk s tenkými buněčnými stěnami. Vytvářejí 25-30 vrstev rozdělených na tři různé části. Dužnina představuje 75-85 % z celkové hmotnosti bobule. Obsahuje cukry, především glukózu a fruktózu. Nejvýznamnější zastoupení mají z organických kyselin kyselina vinná a jablečná, z anorganických kyselina fosforečná. Bývá bohatá na kationty, z nichž je nejvýznamnější draslík, vápník, hořčík, sodík a zinek. Hlavními dusíkatými složkami jsou amonné ionty, aminokyseliny a bílkoviny. Obsahuje i sekundární metabolity – aromatické látky a antokyanová barviva.

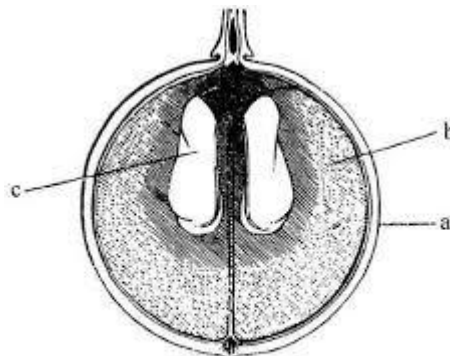
Semena mají ve zralém stavu hruškovitý tvar s prodlouženým zobáčkem, ve kterém se nachází klíček a na opačné straně žlábek. Představuje 0-6 % z celkové hmotnosti bobule. Délka semene bývá 3-8 mm a šířka 3-5 mm. Představují významný zdroj fenolických lá-

tek, díky čemu mají význam pro kvalitu modrých hroznů a červených vín. Počet semen v bobuli a hmotnost semen mohou být různé v závislosti na stanovišti, ročníku a ošetřování vinice.

Velikost bobule bývá odrůdová vlastnost, ale může být ovlivňována i dalšími faktory, např. počtem semen v bobuli, teplotou, světlem a zásobováním vodou [28].



Obr. 1. Stavba hroznu [30]



Bobule na průřezu

a) slupka; b) dužnina; c) pecičky;

Obr. 2. Průřez bobule [29]

2 MIKROFLÓRA BOBULÍ HROZNŮ, MOŠTU A VÍNA

Jednou z klíčových zásad pro předcházení problémů při výrobě vína je zajištění co nejnižšího množství mikroorganismů na povrchu technologicky zralých hroznů před lisováním. Jednotlivá bobule hroznů může obsahovat před zpracováním 10^3 až 10^5 kvasinek. Mezi hlavní faktory, které ovlivňují mikrobiální (zejména bakteriální) populaci, patří geografická poloha vinice, klima a počasí v okamžiku sběru, používání fungicidů na vinici, typ půdy, stáří vinice, odrůda, poškození celistvosti bobulí a metoda sběru [2].

Přirozená mikroflóra bobulí pocházející z prostředí vinic zahrnuje výhradně kvasinky *Kloeckera apiculata* a její teleomorfu *Hanseniaspora uvarum*. Méně jsou zastoupeny rody *Hansenula*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Metschnikowia* a *Rhodotorula* [27]. Velmi vzácně jsou izolovány zástupci druhu *Saccharomyces cerevisiae*, jejichž přítomnost na bobulích lze prokázat až v průběhu spontánního kvašení. Z bakterií se nejčastěji vyskytuje rod *Acetobacter* a *Gluconobacter* nebo bakterie mléčného kvašení [4]. Z plísní se nejčastěji vyskytuje rod *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Uncinula* a *Cladosporium*. *Botrytis cinerea* způsobuje ušlechtilou hnilobu za příznivého počasí, za vlhkého počasí způsobuje zhoubnou hnilobu hroznů [2].

Kvůli bohatému mikrobiálnímu osídlení bobulí je potřeba je ochraňovat před pomnožením nežádoucích mikroorganismů a nakládat s nimi co nejšetrněji až do okamžiku lisování tak, aby nedošlo k jejich poškození.

Získaná šťáva po lisování hroznů je ihned napadána kvasinkami. Do hroznového moštu se dostávají buď z povrchu bobulí, z povrchu vinařského zařízení nebo přidáním čisté kultury ušlechtilých kvasinek. V 1 ml moštu je obsaženo 10^5 až 10^9 divokých a kulturních kvasinek, množství plísní jsou různé podle množství postižených hroznů. Počty spor plísní dosahují až 10^8 /ml, octových bakterií a bakterií mléčného kvašení dosahují 10^4 /ml i více. Tato bohatá mikroflóra se začne po vylisování exponenciálně množit a dominující mikroflórou se stávají kvasinky.

Hroznový mošt lze upravit třemi způsoby. A to odkalením, úpravou cukernatosti a úpravou kyselosti. Odkalení moštu podporuje odstranění mechanických nečistot obsahujících mikroorganismy, jejichž činnost není v průběhu kvašení žádoucí. Cukernatost se v našich klimatických podmínkách upravuje přidáním řepného cukru před počátkem kvasného procesu. Mošty s vysokou cukernatostí hůře kvasí, což je způsobeno koncentrací sacharidů, zvý-

šeným obsahem kyseliny octové a nízkou koncentrací tiaminu. Finální produkt zásadně ovlivňuje obsah kyselin v moštu a ve víně. V případě nízkých koncentrací kyselin je nutné okyselení, např. přidavkem kyseliny vinné nebo L-mléčné. Zvýšení kyselosti má pozitivní vliv na údržnost vyráběného vína, protože se tímto zákrokem omezuje růst kontaminujících mikroorganismů. U mimořádně nepříznivých ročníků se provádí odkyselování moštů, není-li možné předpokládat snížení kyselosti vín přirozenou cestou [2].

Na začátku etanolového kvašení v nepřítomnosti startovací kultury se uplatňuje široká škála divokých kvasinek zahrnující různé druhy rodů *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida* a *Pichia*. Tyhle rody odumírají v průběhu 2-3 dní po zahájení fermentace a jsou nahrazeny různými druhy rodu *Saccharomyces*, které jsou odolné zvyšující se koncentrací etanolu [27]. Podle vlastností vyskytující se mikroflóry jsou vlastnosti finálního produktu různé a kvalita nikdy není stejná [2].

V současnosti se využívá několika možností řízeného kvašení. Zejména použitím komerčních přípravků kulturních kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, kontrolou teploty výrobního procesu a řízením obsahu biologicky aktivních látek [20]. Čisté kultury kvasinek garantují původ a zaručují požadované organoleptické vlastnosti finálního produktu, potlačí nežádoucí mikroorganismy, dosáhne se rovnoměrnějšího průběhu kvasného procesu, přičemž vzniká minimální množství nežádoucích vedlejších produktů. Každoročně se objevují nové kmeny se speciálními vlastnostmi zaměřenými na určité typy vín. Distribuce se zajišťuje v sušené formě, která se označuje jako aktivní suché vinné kvasinky. Použití je snadné a zaručuje rychlý nástup kvašení, nicméně k zajištění kvality vína je nutné kontrolovat mikrobiální aktivitu v průběhu fermentačního procesu a při dlouhodobém používání [2].

V mikroflóře mladých vín dominují rody tolerantní vůči alkoholu [27]. Jsou to např. *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces oviformis*, *Candida vini*, *Candida zeylanoides* a *Pichia* [2].

K mikrobiologické stabilizaci vína před lahvováním se používá sterilizace filtrací (filtrační svíčky). Mikroorganismy ohrožují mikrobiální stabilitu vína, jedná-li se především o vína s vyšším obsahem zbytkového cukru a nižším obsahem alkoholu. Přítomnost vyššího množství oxidu siřitého nemusí zabránit nežádoucímu druhotnému kvašení, proto je vhodné kontrolovat účinnost tohoto technologického kroku [27].

Mikrobiologické kažení vína může být způsobeno kvasinkami rodu *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces ludwi-*

gii; dále kvasinkami tvořícími biofilm např. *Pichia*, *Candida*, *Hansenula*; aerobními bakteriemi *Gluconobacter* a *Acetobacter*; bakteriemi mléčného kvašení *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*; sporulujícími bakteriemi *Bacillus* a *Clostridium*; a plísněmi *Penicillium glabrum* a *Penicillium spinulosum* [2].

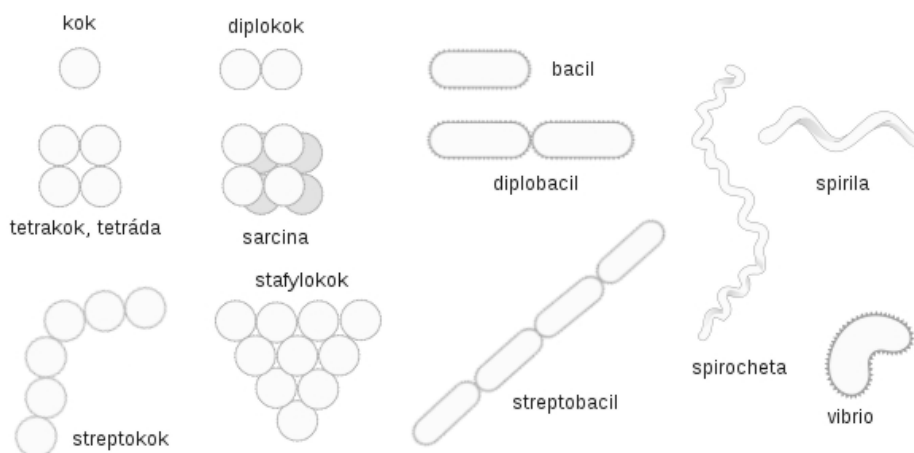
2.1 Bakterie

Jsou součástí mikroflóry hroznu, moštu a vína. Rozdělují se na užitečné, kterými se víno zlepšuje, protože jejich účinkem probíhá ve víně jablečno-mléčná fermentace a škodlivé bakterie, vlivem kterých vznikají ve víně nežádoucí mikrobiologické změny [3].

2.1.1 Morfologie bakterií

Všechny bakterie mají charakteristický tvar a rozměry. Tvar buněk je nejčastěji tyčinkovitý (bacily), méně často kulovitý (koky). Tyčinkovité buňky mají buď tvar rovný, zakřivený, tvar pravidelné spirály nebo dlouhé nepravidelné spirály [4]. Délka spirály závisí na kultivačních podmínkách, především na aciditě, teplotě, obsahu alkoholu, rychlosti rozmnožování [5].

Kulovité vegetativní buňky se nazývají koky. Pokud se rozmnožují dělením pouze v jedné rovině, tvoří řetízky (streptokoky), při dělení ve dvou na sebe kolmých rovinách vytvářejí většinou tetrády, při dělení ve třech na sebe kolmých rovinách tvoří pravidelné balíčky po osmi až několika stech buňkách (sarcíny). Dělením koků v různých rovinách vznikají nepravidelné shluky (stafylokoky) [5].



Obr. 3. Tvary bakterií [31]

2.1.2 Mléčné bakterie

Mléčné bakterie popisuje souhrn společných fyziologických a strukturních vlastností. Jsou grampozitivní, nepohyblivé a asporogenní. energii získávají především z kvašení sacharidů [4].

Většina druhů mléčných bakterií má schopnost odbourávat malát. Část mléčných bakterií má schopnost odbourávat kyselinu citrónovou. Homofermentativní mléčné bakterie tvoří z hexózy výlučně jen kyselinu mléčnou, fruktózo-1,6-difosfátovou dráhou. Heterofermentativní mléčné bakterie tvoří z hexózy kyselinu mléčnou a etanol, případně kyselinu octovou a oxid uhličitý, pentózovou dráhou [8].

Optimální teplota fermentace bakterií jablečno-mléčného kvašení je 20 °C. Jejich aktivita se při teplotě nad 25 °C zpomaluje a při teplotě nad 34 °C se zastavuje jablečno-mléčné kvašení. Nižší teploty jen zpomalují kvašení, nezastavují jej.

Jablečno-mléčné kvašení probíhá převážně po hlavním alkoholickém kvašení a při dokvašení, jelikož jablečno-mléčné bakterie potřebují větší množství dusíkaté výživy, kterou berou z mrtvých autolyzovaných kvasinek [6].

2.1.2.1 Rod *Lactobacillus*

Zastupuje velmi rozdílnou skupinu grampozitivních, fakultativně anaerobních bakterií. Mají protáhlé nepohyblivé buňky, často tyčinkovitého tvaru, které jsou spojeny v párech anebo v řetězcích různých velikostí [9].

Je schopný způsobovat různé typy kvašení. Metabolickým produktem z glukózy je kyselina máselná, kyselina octová a etanol, a z fruktózy manitol [32]. Optimální teplota růstu je 22 °C, ale může růst i při teplotě 8-10 °C. Pro jejich růst je maximální pH 7,2. Jako zdroj energie se považuje přeměna karbamoyl fosfátu na oxid uhličitý a amoniak během rozkladu argininu [31].

Lactobacillus brevis způsobuje ve víně zvýšenou tvorbu těkavých kyselin [3]. *Lactobacillus plantarum* rozkládá ve víně kyselinu vinnou, vinný kámen a glycerol na kyselinu octovou, kyselinu mléčnou a oxid uhličitý. Je to nežádoucí jev, který se nazývá zvrhnutí vína [6].

2.1.2.2 Rod *Oenococcus*

Má nepohyblivé, kulovité nebo elipsoidní buňky většinou spojené v párech nebo krátkých řetězcích [9]. Patří mezi grampozitivní, fakultativní anaerobní bakterie. Metabolickým produktem z glukózy je oxid siřičitý, kyselina mléčná a etanol [40].

Oenococcus oeni přeměňuje glukózu na ekvimolární množství především kyseliny L-mléčné, oxid uhličitý a etanolu nebo acetátu [15]. Má schopnost metabolizovat kyselinu jablečnou z hroznů na kyselinu mléčnou. Je odolný vůči nízkému pH a vysoké koncentraci etanolu [10].

2.1.2.3 Rod *Leuconostoc*

Má kulovité nebo čočkovité buňky v párech nebo v řetězcích. Jsou to heterofermentativní bakterie produkující kyselinu D-mléčnou z glukózy. Hrají významnou roli v organoleptických vlastnostech mléka, másla, sýru, masa a vína [12].

Leuconostoc mesenteroides byl izolován během alkoholového kvašení z hroznového moštu [12]. *Leuconostoc paramesenteroides* byl izolován z vína [10].

2.1.2.4 Rod *Pediococcus*

Mají nepohyblivé, někdy oddělené buňky, kulovitěho tvaru vyskytující se po čtyřech, nikoliv v řetězcích [11]. Z vína byl izolován *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus inopinatus* a *Pediococcus pentosaceus* [9].

2.1.3 Octové bakterie

Při technologii vína jsou nežádoucí. Každý vinař se snaží zabránit jejich rozmnožování. Proto je dobré znát fyziologické vlastnosti octových bakterií a ty plně využívat při jejich eliminaci [13]. Patří mezi obligátní aeroby, které pro svoji činnost potřebují nevyhnutelně kyslík [6].

Jsou velmi citlivé vůči oxidu siřičitému. Proto je nutné správně sířit, hlavně rmut a mošt z nahnílých hroznů se musí silně sířit. Jen tímhle způsobem lze zabránit vývinu octových bakterií.

Potřebují pro svůj život poměrně vysokou teplotu (25 až 35 °C). Z toho plyne, že je potřeba kvasit mošty při nižších teplotách, čímž silně omezíme aktivitu bakterií. Je to důležité hlavně při nakvašování modrých rmutů.

Nutně potřebují kyslík ze vzduchu jako akceptor vodíku. Proto by bylo výhodné kvasit pod kvasnými zátkami a udržovat plné a uzavřené nádoby ihned po vykvašení.

Protože jsou všude rozšířené, je nutné udržovat dokonalou čistotu ve sklepech a dalších zařízeních. Což platí o všem, co přijde s moštem a vínem do styku [6].

2.1.3.1 Rod *Acetobacter*

Acetobacter xylinum se nejvíce vyskytuje ve sklepech. Ve vínech méně, protože je málo odolný vůči alkoholu. Během octového kvašení vytváří silnou slizkou kožku. Nejčastěji se vyskytuje na prosakujících místech sudu nebo okolo kanalizace. Optimální vegetační teplota je nad 30 °C.

Acetobacter orleanense má buňky oválného až paličkovitého tvaru, které vegetují jednotlivě i v řetězcích. Vytvářejí kožku, která je jemná, ale pevná a zvrásnělá. Optimální vegetační teplota je 20 až 30 °C. Buňky jsou velmi odolné vůči alkoholu, a proto mohou způsobit za určitých podmínek naoctění vína.

Acetobacter ascendens tvoří krátké paličkovité buňky. Vegetují jednotlivě nebo po dvou vedle sebe. Vytvářejí kožku, která je jemná, snadno se rozpadá a vysoko vzlíná po stěnách kultivačních nádob. Silně kalí kultivační prostředí. Jsou velmi odolné vůči alkoholu. Produkují nejen kyselinu octovou, ale i etylester kyseliny octové. Jsou velmi rozšířené a nebezpečné [6].

2.1.4 Změny zapříčiněné činností bakterií ve víně

Vlivem mléčných bakterií mohou nastat ve víně užitečné i nežádoucí změny. Užitečné změny jsou ty, při kterých se účinkem mléčných bakterií sníží obsah kyseliny jablečné a zvýší obsah kyseliny mléčné, přičemž ostatní složky vína jsou ovlivněny jen ve velmi malé míře. Nežádoucí změnou je jablečno-mléčné kvašení bakteriemi, které produkují nadměrné množství prchavých kyselin. Nežádoucí jsou i změny v obsahu kyseliny vinné a glycerolu, které nastávají účinkem mléčných bakterií.

Vlivem octových bakterií nastávají vždy nepříznivé změny. Inhibitory octových bakterií jsou především vyšší obsah etanolu, 30 až 50 mg/l volného oxidu siřičitého, ochrana vína před nadměrným okysličováním a přiměřená nízká teplota uskladňování vína (12 - 15 °C) [3].

2.2 Kvasinky a kvasinkové mikroorganismy

Pro vinaře jsou kvasinky nejdůležitější skupinou mikroorganismů, protože bez kvasinek rodu *Saccharomyces* by byla produkce kvalitního vína nemožná. Kromě rodu *Saccharomyces* jsou zde další rody a druhy, které mají dopad na kvalitu vína, jak pozitivní tak negativní [11].

Jsou to heterotrofní eukaryotní mikroorganismy, které patří mezi houby (*Fungi*). Většina druhů má schopnost zkvašovat monosacharidy a některé disacharidy, příp. i trisacharidy na etanol a oxid uhličitý [5].

Kvasinkové mikroorganismy jsou druhy tvořící podobné kolonie jako kvasinky, ale mimo jednotlivých pučících buněk vytváří i různé typy filamentů, jsou to nepravé i pravé hyfy, které nevytváří spory [14].

2.2.1 Morfologie kvasinek a kvasinkových kolonií

Kvasinky mohou mít okrouhlý, oválný, elipsový, protáhnutý nebo citrónovitý tvar. Tvar buněk i jejich velikost jsou ovlivněny kultivačními podmínkami, fyziologickými procesy a stářím buněk [5].

Vytvářejí často keříčkovité útvary nebo řetízky protáhnutých buněk směřujících od kolonií do prostředí, po povrchu i do hloubky, na kterých pučí kvasinkové buňky v chomáčcích. Veškeré tohle seskupení připomíná hyfy. Články filamentu jsou jednotlivé, jednojaderné buňky, které mezi sebou nemají spojené póry. Ale jelikož jsou podobné hyfám, mluví se o nepravých hyfách nebo pseudomycéliu. Odlišuje se od pravého mycelia tím, že články jeho řetízků tvoří jednotlivé buňky s jedním jádrem a řetízky buněk nejsou spojené póry. Hyfa je rozdělena přehrádkami, které mají malé póry, aby jimi nemohly procházet buněčné struktury [14].

K rozpoznání druhů kvasinek se sleduje i tvorba obrovských kolonií [4]. Když naočkujeme kvasinky na povrch živného média zpevněného agarem nebo želatinou, buňky se rozmnoží tak, že se časem vytvoří kolonie nebo nátěr. Charakter kolonie závisí na chemickém a fyzikálním složení prostředí, na povaze zpevňovačla a na podmínkách kultivace [3].

Kolonie se posuzují po třech až čtyřech týdnech. Sledujeme vzhled, konzistenci, okraj, radiální nebo koncentrické rýhování, spodek kolonie a její barvu. Především posuzujeme, je-li kolonie hladká, drsná nebo slizovitá. Povrch může být kučeravý, moučný, lesklý, matný nebo ve středu kráterovitý. Kolonie jsou buď vysoké, nízké, rozprostřené, okraj bývá

rovný, ucelený, pilovitý, cípovitý, lalokovitý nebo kořínkový. Slizovité kolonie se mohou roztékat, proto neudrží okrouhlý tvar. Jsou i případy, kdy se okolo kolonie vytváří zakalená zóna, která vzniká z krystalků nejčastěji lipidového charakteru [14].

2.2.2 Rozmnožování kvasinek

2.2.2.1 Vegetativní rozmnožování

Vegetativně se kvasinky rozmnožují pučením. Při pučení vzniká malá dceřiná buňka (pupen), která je spojena kanálkem s mateřskou buňkou. Před pučením dochází ke splývání membrán endoplazmatického retikula a po pučení k jeho dělení, k opakovanému dělení vakuol a ke změně tvaru mitochondrií. Do pupenu vstupují drobné vakuoly a mitochondrie. Při tom začne mitotické dělení jádra a jeho migrace k pupenu. S jádrem přecházejí do nového pupenu další složky cytoplazmy. Pak se kanálek mezi mateřskou a dceřinou buňkou uzavře cytoplazmatickou membránou a v pupenu se endoplazmatické retikulum syntetizuje a rozšiřuje. Jakmile se vytvoří buněčná stěna mezi mateřskou a dceřinou buňkou, vzrůst velikosti pupenu a spojení drobných vakuol v jedinou vakuolu je pučení ukončeno. Většinou se dceřiná buňka od buňky mateřské ihned oddělí. Někdy zůstanou buňky spojeny i po několikátém dělení a vytvoří buněčné svazky [5].

2.2.2.2 Pohlavní rozmnožování

Při pohlavním rozmnožování nastává párování mezi dvěma opozitními párovacími typy. Spojením dvou haploidních buněk se vytváří zygota a z něj vřecko nebo bazidium. Spojením jejich jader vzniká diploidní jádro. Ve vřecku se vytváří askospory a na bazidiu bazidiospory [5]. Diploidní jádro se dělí meiózou. Meióza je redukční dělení, kdy se diploidní jádro dělí ve čtyři haploidní jádra [14].

2.2.3 Kvasinková mikroflóra půdy

Hlavním zdrojem mikroorganismů, které se do moštů dostanou z hroznů, je půda ve vinici. Kvasinky mohou být z hroznů smyty deštěm během sběru. Kromě kvasinek se z půdy na hrozny i do moštů dostává řada plísní i nežádoucích bakterií [15].

Největší vliv na život kvasinek v půdě mají zralé nebo polozralé bobule hroznů. Takové bobule bývají často narušeny špačky, padají na zem, mohou být rozšlapány nebo jinak mechanicky rozmačkány a sladká šťáva při vsáknutí do země slouží kvasinkám jako živný

substrát. Také při sklizni hroznů kombajnem dochází k určitému nasycení půdy šťávou z bobulí hroznů.

V půdě je nejvíce kvasinek v době po sklizni a v době, kdy hrozny zrají. Na výskyt mají velký vliv vodní srážky. V létě je v půdě kvasinek nejméně, protože pod vlivem velkého zahřívání půdy hynou. Nejčastěji se vyskytují *Saccharomyces cerevisiae*, méně *Kloeckera apiculata*, *Pichia membranaefaciens* a *Candida pulcherrima* [6].

2.2.4 Kvasinková mikroflóra hroznů

Kvasinky se vyskytují na bobulích hroznů v místech, kde na slupce vznikají drobné trhlinky, kterými vytéká mošt s cukrem. Častěji můžeme zaznamenat výskyt kvasinek v místech, kde přisedá stopečka na vlastní bobuli.

Jejich množství je za normálních podmínek dostatečné k tomu, aby proběhlo spontánní kvašení. Mikroflóra se liší v závislosti na odrůdě révy vinné, klimatických poměrech, půdních podmínkách, hnojení a ošetřování vinice. Podstatný vliv na rozvoj mikroflóry na hroznech má také způsob sklizně, nádoby pro transport hroznů a vlastní příjem ke zpracování ve vinařském provozu nebo vinném sklepe [16].

2.2.5 Kvasinková mikroflóra moštu a její změny během kvašení

Kloeckera apiculata a *Candida pulcherrima* se vyskytují zejména v počáteční fázi kvašení bez ohledu na ekologické podmínky vinohradnické oblasti. Zodpovídají za začátek spontánního kvašení moštu a rmutu. *Saccharomyces cerevisiae* navazují zpravidla po 2 až 3 dnech na aktivitu uvedených méně výkonných sporogenních kvasinek, které jsou eliminované vlastním metabolitem kvašení – alkoholem. Jsou podstatně lépe přizpůsobené prostředí a odolnější vůči vznikajícímu alkoholu, velmi rychle potlačí nesporeující druhy, takže ve fázi hlavního (bouřlivého) kvašení, dochází k úplné dominanci tohoto druhu. *Saccharomyces oviformis* jsou typické dokvašující kvasinky, které jsou zodpovědné za vykvašení posledních zbytků cukru. V sudových, občas i v láhvových vínech vyvolávají sekundární kvašení vín se zbytky cukru a s tím spojené zákal [4].

Hansenula anomala var. *anomala* může ovlivňovat alkoholické kvašení v některých vinohradnických oblastech [8].

2.2.6 Kvasinková mikroflóra vína

Spektrum druhů kvasinek mladých vín je na rozdíl od moštu poměrně úzké. Plyne to z přirozené selekce odolných druhů během kvašení a ze zemědělských podmínek prostředí. V mladých vínech převládají kvasinky, které jsou rezistentní proti alkoholu a s aerobním metabolismem.

V lahvových vínech převládají vzdušné epifyty a osmofilní kvasinky, které jsou odolné proti některým konzervačním prostředkům, používaným ve vinařství.

Kvasinkovou mikroflóru vína ovlivňují kvasinky přírodních stanovišť a kontaminující mikroflóra provozních místností, vinných nádrží, stěn a sklepů. V dřevěných sudech převládá rod *Saccharomyces*, v sklo-cementových cisternách převládá rod *Candida*. *Saccharomyces cerevisiae* způsobuje v mladých vínech druhotné kvašení [8].

2.2.7 Přehled nejdůležitějších vinných kvasinek

2.2.7.1 Rod *Hanseniaspora*

Buňky jsou citrónovité, vejcovité nebo kulovité. Má tendenci být fruktofilní [6]. Rod tvoří tři druhy: *H. osmophila*, *H. uvarum* a *H. valbyensis* [11].

Hanseniaspora uvarum se často vyskytuje na bobulích. Tvoří rudimentární nebo stromečkovitě větvené pseudomycelium. Inhibuje růst bakterií [14].

2.2.7.2 Rod *Issatchenkia*

Projevuje se multilaterálním pučením stejně jako tvorbou pseudomycelia. Zkvašuje glukózu, ale dusičnan draselný neasimilují. *Issatchenkia orientalis* byl nalezen v ovocných džusech a ve vínech. Tvoří vejčité, až protáhlé buňky [11].

2.2.7.3 Rod *Pichia*

Vytváří na povrchu moštu dobře vyvinutou kožku. Neasimilují dusičnan draselný. *P. fermentans*, *P. membranaefaciens* a *P. farinosa* se vyskytují v moštech a vínech [27].

Pichia fermentans má buňky oválného, válcovitého až protáhlého tvaru. Asimiluje a zkvašuje pouze glukózu. Má polokulovité spory po 1 až 3 ve vřecku. Tvoří bohaté pseudomycelium [8].

Pichia membranaefaciens má buňky válcovitého, protáhnutého až oválného tvaru. Asimiluje pouze glukózu. Využívá etanol a dusičnan draselný neasimiluje.

Pichia farinosa má buňky cylindrického až velmi protáhnutého tvaru. Vytváří silnou, zvrásnělou a suchou kožku v tekutém prostředí. V málo alkoholických vínech může vytvářet kříš [6].

2.2.7.4 Rod *Saccharomyces*

Je velmi rozšířený v mošttech a vínech, méně v půdě a podle ekologických podmínek na některých orgánech révy vinné [6]. Z hlediska výroby jsou nejdůležitější *S. cerevisiae* a *S. bayanus* [11].

Saccharomyces cerevisiae Hansen má buňky oválného až eliptického tvaru. Někdy bývají i mírně protáhlé. Spory jsou hladké, kulaté, někdy mírně protáhlé [6]. Je zkvašována a plně asimilována glukóza, galaktóza, laktóza, sacharóza a maltóza, rafinosa do 1/3. Nevyužívá etanol a dusičnan draselný [8].

Saccharomyces bayanus má buňky oválného až protáhlého tvaru. Sporulace je dokonalá. Vytváří dobře vyvinuté pseudomycelium. Je zkvašována a asimilována glukóza, galaktóza, sacharóza, maltóza a kompletně rafinóza. Nevyužívají etanol a dusičnan draselný [6].

2.2.7.5 Rod *Schizosaccharomyces*

Buňky má válcovitého, vejčitého nebo cylindrického tvaru. Hlavním druhem nalezeným v hroznovém moštu nebo víně je *Sch. pombe*, který fermentuje a asimiluje glukózu, sacharózu, maltózu a rafinózu. Nemůže použít etanol jako zdroj uhlíku a dusičnan draselný jako zdroj dusíku. Kyselinu jablečnou zkvašuje na etanol a oxid uhličitý [11].

Schizosaccharomyces malidevorans nezkvašuje maltózu. Může se použít na odbourávání kyseliny L-jablečné ve víně [3]. Během kvašení vytváří velké množství sirovodíku [6].

2.2.7.6 Rod *Hansenula*

Tvoří na povrchu moštu a vína dobře vyvinutou kožku. Asimiluje dusičnan draselný jako jediný zdroj dusíku. Tvoří estery, zejména octanu etylnatého [27].

Hansenula anomala má buňky válcovitého až protáhnutého případně oválného tvaru. Zkvašuje a asimiluje glukózu, galaktózu, sacharózu a maltózu, rafinózu do 1/3 [8].

2.2.7.7 Rod *Torulopsis*

Má buňky kulatého nebo oválného až mírně protáhlého tvaru. Vyznačují se multilaterálním pučením. Jednotlivé druhy byly nalezeny na zelených částech révy vinné, na hroznech, v mošttech a jako kontaminující mikroflóra v některých výrobních zařízeních.

Torulopsis glabrata má buňky malé oválného až vejčitého tvaru. Netvoří pseudomycelium. Asimiluje a zkvašuje glukózu. Nevyužívá ostatní cukry, a neasimiluje etanol a dusičnan draselný [6].

2.2.7.8 Rod *Candida*

Buňky mají rozmanitý tvar, kulovitý, elipsoidní, cylindrický nebo protáhlý. Často se vyskytují ve shlucích nebo v řetízcích [27]. Nezkvašuje sacharidy a asimiluje pouze glukózu. Asimiluje etanol, ale nevyužívá dusičnan draselný. Vytváří na povrchu vína kožku [14].

Candida pulcherrima se vyskytuje ve všech našich vinohradnických oblastech a tvoří dominantní podíl mikroflóry hroznů. Je zodpovědná za zahájení spontánního kvašení moštů. Nevyskytuje se ve vínech, protože má malou prokvašovací schopnost. Při spontánním kvašení v mošttech se rychle rozmnožují, ale jsou brzy potlačeny jinými vitálnějšími kvasinkami [6].

Candida krusei má buňky oválného až protáhnutého tvaru, tvoří řetízky nebo shluky. Tvoří na povrchu moštu hrubší vzlínající šedou kožku. Zkvašuje a asimiluje glukózu. Využívá etanol a neasimiluje dusičnan draselný [8].

Candida parapsilosis má buňky oválného tvaru. Asimiluje a zkvašuje glukózu a slabě galaktózu. Navíc asimiluje sacharózu a maltózu. Využívá etanol a neasimiluje dusičnan draselný [4].

Candida vini má buňky válcovitého až oválného tvaru inkrustované tukovými kapkami. Vyskytuje se v delších řetízcích nebo shlucích. Rychle se tvoří na moště a víně hrubší, suchá šplhající se kožka [6]. Neprodukuje estery, nekvasí cukry a asimiluje jen glukózu. Nevyužívá dusičnan draselný, dobře asimiluje etanol. Výskyt v moště je velmi vzácný. Tvoří dominantní část kvasinkové mikroflóry mladých vín téměř ve všech našich vinohradnických oblastech [8].

Candida zeylanoides má buňky oválného až protáhlého tvaru. Je to kvasinka mladých vín. Není schopna tvořit kožku na povrchu tekutého prostředí [6].

2.2.7.9 Rod *Kloeckera*

Je standardní součástí mikroflóry začáteční fáze alkoholového kvašení hroznového moštu.

Kloeckera apiculata má buňky citrónovitého, oválného až protáhlého tvaru, které pučí bipolárně. Zkvašují a asimilují pouze glukózu. Tvoří dominantní podíl začáteční mikroflóry spontánního kvašení moštů [8].

2.2.7.10 Rod *Rhodotorula*

Vyznačuje se oválnými až protáhlými buňkami. Nejvíce se vyskytují na stěnách sklepů, popř. na jejich podlaze. Tenhle rod bývá nejčastěji zastoupen druhy *Rhodotorula glutinis* a *Rhodotorula rubra*. Kvůli malé odolnosti vůči alkoholu se ve vínech nevyskytují, a tudíž nemají žádný technologický význam [6].

2.3 Plísně

Jsou to mikroorganismy, které spolu s kvasinkami a bakteriemi tvoří mikroflóru vinné révy během vegetace. Vyskytují se na stěnách sklepů, sudů, zařízení a v neodborně ošetřovaných, hlavně dřevěných nádobách na víno. Podle přítomnosti a typu pohlavního rozmnožování se plísně dělí do třídy Zygomycetes a Ascomycetes [3].

2.3.1 Třída Zygomycetes

2.3.1.1 Rod *Mucor*

Tvoří rozvětvený sporangiofor [18]. Vyskytuje se na vinné révě po celý rok [27]. Roste i bez přístupu vzduchu pod hladinou kultivační tekutiny obsahující cukr, přičemž tvoří řetízky buněk podobných kvasinkám, které produkují malé množství alkoholu. Je součástí mikroflóry bobulí, hlavně znečištěných od hlíny, proto se vyskytují téměř v každém hroznovém moště. Moc se nerozmnožují, protože jejich růst potlačují aktivnější vinné kvasinky během kvašení [3].

2.3.1.2 Rod *Rhizopus*

Vyskytuje se na hniјících bobulích, na hroznech znečištěných půdou, ve vzduchu a v půdě. Z počátku má mycelium bílé, později hnědé. Netvoří buňky podobné kvasinkám. Na začátku v kvasícím moštu ji ihned potlačí vznikající alkohol, tudíž její činnost se v moště prakticky neprojevuje [18].

2.3.2 Třída Ascomycetes

Plísně tvoří dělené hyfy a askospory. Mohou se rozmnožovat nepohlavně, konidiami, oidiiemi a chlamydosporami [3].

2.3.2.1 Rod *Botrytis*

Z počátku má mycelium bílé až šedobílé, později hnědé až šedohnědé. Mycelium napadá slupku bobulí, narušuje ji a tím umožňuje silnější odpařování vody z dužiny [27]. Plíseň může zapříčinit ušlechtilou nebo zhoubnou hnilobu hroznu. Závisí to na meteorologických podmínkách. Pokud je suché a slunečné počasí v období dozrávání, vytváří se ušlechtilá plíseň. V nepříznivých podmínkách se může zvrhnout na zhoubnou hnilobu. Produkuje oxidační enzymy, které katalyzují přenos kyslíku na polyfenoly hroznových bobulí a vína, přítomných ve formě tríslovin a barviv, což zapříčiní hnědnutí vína [18].

2.3.2.2 Rod *Cladosporium*

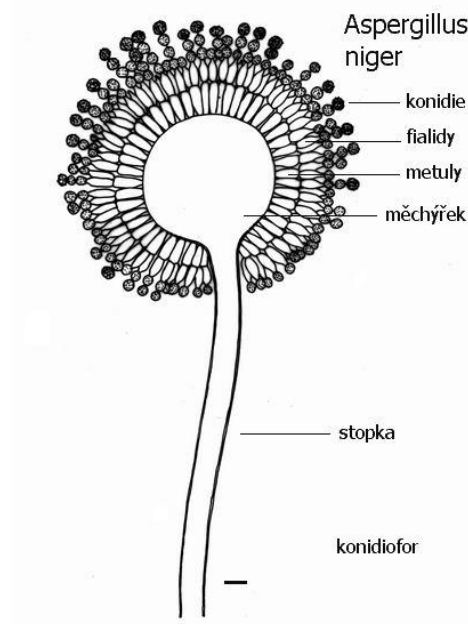
Má schopnost vázat organické a anorganické výpary ze vzduchu. Má také schopnost asimilovat výpary vína, díky níž čistí vzduch ve vinném sklepech a reguluje jeho relativní vlhkost, takže ve sklepech má funkci biologického filtru. Z počátku je bílá, později přechází do odstínů šedé až černé barvy [27].

2.3.2.3 Rod *Aspergillus*

Na vinné révě se vyskytuje hlavně v suchých slunečných letních měsících, méně na podzim a v zimních měsících téměř vůbec [18].

Aspergillus niger Van Tieghem má zpočátku bílé, poté žluté až hnědé mycelium. Má černé, okrouhlé konidie. Nachází se na různých orgánech vinné révy, hlavně na nahnilých bobulích.

Aspergillus glaucus De Bary má žlutohnědé mycelium. Starší kultury mají hnědé zbarvení. Vyskytují se všude ve vinicích a vinných sklepech [6].



Obr. 4. Tvar plísně *Aspergillus niger*

[33]

2.3.2.4 Rod *Penicillium*

Tvoří bezbarvé hyfy. Má rozdělený i konidiofor příčnými příhradkami. Jsou rozvětvené do útvaru připomínající štětečky [6].

Penicillium glaucum má zpočátku bělavé, později šedé mycelium. Napadá nejen poškozené, ale i celkem zdravé hrozny. Má bohatý enzymový systém, který umožňuje plísni napadat cukry, kyseliny, dusíkaté látky, třísloviny a barviva. Velké škody zapříčiňuje na červených a modrých odrudách hroznů, kde za krátký čas rozloží třísloviny i barvivo bobulí.

Penicillium purpurogenum má žlutočervené mycelium. Červené barvivo plísně přechází v moštu do roztoku, tudíž po čase nabývá mošt červeného zabarvení, jako kdyby pocházel z červených hroznů. Vyskytuje se často v půdě a na různých částech vinné révy [18].

3 VÝROBA VÍNA

3.1 Sběr hroznů

Důležitým faktorem kvality vína je kvalita hroznu na vinohradu. Na kvalitu hroznů má vliv řada faktorů. Jako např. daná odrůda vysazená na správné půdě a ve správné oblasti, stáří a kvalita vinic, výnosnost na hektar, kvalitní sběr a počasí v daném ročníku [19].

Cílem je vždy otrhat dokonale zralé hrozny. V případě, že jsou napadené plísní, se musí probrat a hnijící vyhodit. Příliš časný sběr může vést k nezrale kyselým bílým vínům a hubeným, tříslovitým červeným [20].

3.2 Příjem hroznů

Je snahou, aby ve vinařském provozu převažovaly krátké dopravní cesty, z důvodu šetrného způsobu příjmu a charakteru produktu tvořeného někdy celými hrozny, jindy rmutem [23]. Je využíván buď vertikální postup zpracování s využitím samospádu, nebo u horizontálních cest jsou využívány pásové nebo šnekové dopravníky v kombinaci s vhodnými typy čerpadel, které využívají hadice nebo potrubí s velkým průměrem [24].

Účelem příjmových zařízení je zajistit šetrný a rychlý příjem sklizených hroznů při dodržení všech hygienických standardů [23].

Příjem hroznů může být z technologického hlediska realizován prostřednictvím příjmových van, překlápěčů na plastové velkoobjemové bedny, vibračních dávkovacích násypek nebo transportních pásů [23]. U menších vinařských provozů může být příjem řešen jejich přímým vyprazdňováním do násypek drtiče, mlýnkoodstopkovače nebo přímo do koše [24].

3.3 Odstopkování a drcení hroznů

Mělo by proběhnout co nejdříve, tedy pár hodin po sběru plodů. Hrozny jsou vsypány do mlýnků a dochází k narušení plodů a uvolnění bobulí na straně jedné a třapin na straně druhé. Nesmí dojít k poškození třapin, protože chlorofyl obsažený v třapinách by přešel do vinného moštu a dále do vína, které by negativně ovlivnil. Třapiny navíc obsahují třísloviny. Chlorofyl i třísloviny by mohly přenést do vína trpké a hořké látky [19].

Drtiče hroznů jsou tvořeny násypkou, která přivádí hrozny k drtícím válcům vyrobeným s různými profily z pryže, hliníku nebo jiného materiálu odolného vůči korozi [23]. Podle

charakteru hroznů lze vzdálenost drticích válců regulovat tak, aby docházelo k šetrnému narušení drcených bobulí bez porušení semen [24].

Mlýnkoodstopkovače představují standardní zařízení slučující drtič i odstopkovač [23]. Odstopkování zajišťuje pevné nebo rotující válcové síto vyrobené z nerezové oceli nebo odolného plastu. Síto je opatřeno otvory, které umožňují propad oddělených bobulí [24].

3.4 Lisování hroznů

Přímo ovlivňuje výslednou kvalitu vína. Je nutné dosáhnout maximálního množství vyli-sovaného moštu a zároveň zachovat jeho prvotřídní kvalitu. Čím je lisování šetrnější, tím je mošt i víno kvalitnější.

U červených vín probíhá lisování až po nakvašení hroznů. Po úplném prokvašení se oddělí slupky od moštu, získá se samotok. Vylisováním se získá víno bohatší na třísloviny a barvu. Vylisované víno se nechá 24 hodin v klidu, aby mohly pevné částice a kvasnice sedimentovat. Odkalený mošt se stočí do nerezových nádob nebo dřevěných sudů [19].

Lisování může být provedeno mechanicky (tlakem) nebo odstředivou silou [23]. Účinnost lisování je ovlivněna druhem lisovacího zařízení, konzistencí lisovaného materiálu, stupněm zralosti, způsobem zpracování před lisováním, tloušťkou lisované vrstvy a počtem lisovacích cyklů [24].

Při lisování vznikají 3 frakce – scezený mošt (odtéká volně z lisu, obsahuje vyšší podíl kyselin a cukrů, je světlejší a má nižší extrakt oproti ostatním frakcím, označuje se jako „samotok“), lisovaný mošt (získává se lisováním a se scezeným moštem se mísí) a dolisek (vzniká při lisování vyšším tlakem, kdy se poškozují slupka bobulí, mošt potom obsahuje vyšší podíl tříslovin, barviv a minerálních látek, a má současně nižší obsah kyselin a cukrů) [23].

Využívají se diskontinuální a kontinuální lisy. U *diskontinuálních lisů* se skládá každý cyklus ze čtyř základních fází: plnění koše rmutem nebo celými hrozny, lisování suroviny, uvolnění matolin a vyprazdňování matolin. Sem patří lisy mechanické, hydraulické a pneumatické [23]. U *kontinuálních lisů* je lisovaný produkt do pracovního ústrojí plynule přiváděn a lisován a výlisky plynule odchází. Patří sem šnekové a pásové lisy [24].

3.5 Nakvášení hroznů

Někdy probíhá i u bílých hroznů, aby se extrahovalo více aromatických látek ze slupek. [20]

Použití nakvášení hroznů závisí na odrůdě révy vinné a typu vína, který chceme vyrobit, na stupni vyzrálости bobulí a na jejich zdravotním stavu. Pro kvalitní nakvášení jsou potřeba studené hrozny zbavené třapin, listů a úlomků letorostů, které by mohly negativně ovlivňovat chuťový projev vína.

Délka nakvášení se pohybuje nejčastěji mezi 12-20 hodinami. Někdy může trvat 6 až 48 hodin. Pro úspěšné nakvášení je důležitá řízená teplota (10-15 °C) a nepřítomnost kyslíku. Může vést ke snížení obsahu kyselin a ke zvýšení hodnoty pH [21].

U výroby červených vín se rozdrčené a odzrněné hrozny nechají nakvášet v uzavřených nádobách, rototancích, moderních vinifikátorech nebo otevřených kádích. Ze slupek hroznů se louhují barviva a třísloviny.

Za optimální teplotu kvašení se považuje asi 29 °C a dobu asi 5-10 dní. Záleží na typu vína. Při kvašení v nádobách vzniká na povrchu rmutový klobouk, což jsou slupky bobulí a zbytek třapin je nadnášen tvořícím se oxidem uhličitým. Rmutový klobouk je třeba ponořovat, v kádích pomocí tyče, aby byly slupky neustále v kontaktu s moštem, v rototancích jsou pro tento účel speciální spirály, které promíchávají rmut.

Kvašení se podporuje:

- Zahříváním – rmut se zahřívá na 50 °C a přidají se pektolytické enzymy pro lepší vylouhování barviva
- Přídavkem kulturních kvasinek
- Tlakem CO₂ – prokvášením bez přístupu vzduchu se odbourávají kyseliny a vzniká jemnější typ vín [19]

3.6 Fermentace

Fermentace či kvašení je proces, který se nazývá anaerobní glykolýza. Kvašení moštu způsobují čisté a vyšlechtěné kultury vinných kvasinek (*Saccharomyces*), které přeměňují jednoduché cukry na alkohol a oxid uhličitý, který uniká do vzduchu. Dalším vedlejším produktem je teplo.

Při tvorbě alkoholu se mošt vinné révy pomalu mění na víno. Kvašení může probíhat v plastových nádobách. Dnes se používají hlavně nerezové tanky. Kromě vybraných kultur kvasinek, které se používají při kvašení, lze použít i přirozenou mikroflóru. Při tomto způsobu fermentace dochází k výraznému zvyšování teploty moštu, a proto se často používá tzv. „řízená fermentace“. Pláště nerezových tanků se chladí tak, aby jejich teplota nezpůsobila vysoké odpařování aromatických látek. Čím proces fermentace proběhne pomaleji, tím má výsledný nápoj více aromatických látek. Hlavním faktorem je čistota ve všech výrobních prostorách. Kvasinky se při kvašení rozmnožují pučením a padají ke dnu, kde vytvářejí kvasniční kaly [19].

3.7 Jablečno-mléčná fermentace

Zmírňuje kyselost přeměnou kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou a oxid uhličitý [19]. Jablečno-mléčnou fermentací procházejí všechna červená vína, aby nebyla drsná. U bílých vín se využívá málo [20].

3.8 Školení vína

Je soubor opatření vedoucích k maximálnímu zvýšení kvality budoucího vína. Klid a ležení v tancích nebo sudech vínům prospívá. Při tom dochází k dokvašení a k přeměně některých látek. Cílem je dosažení určitého stupně zralosti vína, chemické a biologické stability, a aby víno mohlo být lahvováno [19].

3.8.1 Síření vína

Proces síření se zatím nepodařilo nahradit. Při tomto procesu se víno chrání před znehodnocením působících mikroorganismů a případné oxidaci. Zasiřením před lahvováním zvyšujeme jeho stabilitu. Hrozny, které jsou méně kvalitní nebo zpracovávány v nečistém prostředí, jsou předpokladem pro vyšší míru zasíření [19]. Účinnost oxidu siřičitého je závislá na pH a hladině fenolických látek. Proti růstu mikroorganismů je aktivní pouze molekulární oxid siřičitý. Příliš vysoká koncentrace oxidu siřičitého neprospívá lidskému organismu. Poskytuje typický štiplavý zápach, jeho konzumace vede k bolesti hlavy, škrábání v krku a alergickým reakcím konzumenta [22].

3.8.2 Čiření vína

Čiření vína je proces, kterým se odstraňují z vína kalící částice a nestabilní látky, které by mohly vést v budoucnu k zákalu nebo druhotné fermentaci nápoje. Dříve se používal ben-

tonit. Bentonit je jemně rozemletá částice, která zvolna propadne tekutinou a strhne s sebou kalící částice. K čiření se používaly i vaječné bílky. Dnes se čiridlo rozděluje na s kladným a záporným nábojem. Volíme ho podle toho, co chceme odstranit [19].

3.8.3 Filtrace

Filtrace je proces, kde odstraňujeme prostřednictvím filtrů mikroorganismy a kalící částice. Víno zbavíme kvasničných kalů, které vznikly při fermentaci. K filtraci se používají speciální deskové nebo křemelinové filtry. Cílem je stabilita vína a jeho schopnost vydržet bez nežádoucích změn v kvalitě i po několik let [19].

Rozlišuje se filtrace povrchová a hloubková. *Povrchová filtrace* zachytí kalové částice, které jsou větší než velikost pórů použité filtrační látky. Je typická pro křemelinovou a membránovou filtraci. Při filtraci křemelinou se předchází ucpání pórů stálým napláváním malých dávek křemeliny a tím dochází k obnovování povrchu filtrační plochy. Pokud se ucpou póry na povrchu filtrační vrstvy, je nutné ji propláchnout zpětným tlakem vody. U kontinuálních naplavovacích filtrů se odřežou či oškrábnou zanesené povrchové vrstvy [23]. *Hloubková filtrace* se používá u filtračních vložek. Zachytí se při ní kalové částice, které jsou menší než velikost pórů. Zachycení může být mechanické v klidových místech kapilár nebo vlivem adsorpčních sil na povrchu filtračních hmot daných rozdílem elektrických nábojů na filtračních vláknech a u kalových částic [24].

3.8.4 Zrání vína

Při zrání vína probíhá terciární aromatizace vína a terciární buket. Bílé víno zraje rychleji než červené. Červené víno by mělo zrát alespoň 1 rok. Zrání probíhá ve skleněných nebo dřevěných nádobách či nerezových tancích [19].

3.9 Lahvování

Výslednou kvalitu vína přímo ovlivní úroveň lahvacího procesu [19].

Důležitým momentem před lahvováním je správná příprava vína. Spočívá v jeho chemicko-fyzikální a mikrobiologické stabilizaci, tak aby nedošlo v průběhu dalšího vývoje vína v láhvi k negativním změnám [23]. Všechny nedostatky po lahvování vína nelze vůbec nebo s velkými obtížemi napravit [24].

Moderní linky jsou tvořeny vykladačem lahví, systémem dopravníků, myčkou lahví, plnicí jednotkou, zátkovacím a etiketovacím zařízením, zařízením pro detekci čistoty lahví, pl-

nosti a kompletnosti adjustáže, zařízením pro skupinové balení lahví a jejich paletizaci [23].

Vlastní plnicí část linky zajišťuje naplnění lahve na nastavenou a přesnou výšku hladiny, uzavření láhve potřebným typem uzávěru s provedením záklopky a nalepení etiket [23]. Tyto operace jsou běžně slučovány do propracovaných automatizovaných systémů, které se označují jako monobloky [24].

U linky s lineárním přísunem lahví jsou při plnění seřazené lahve přiváděny pomocí pásového dopravníku k plničce, odkud jsou po naplnění lineárně odváděny [24].

U linky s oběžným přísunem lahví jsou láhve pomocí dopravníku přisouvány k zaváděcímu kolu opatřenému polokruhovými výřezy, pomocí kterých jsou postupně prostřednictvím unášečů naváděny, vystředěny a uchyceny pod plnicí ventil [23].

Plnicí zařízení se podle principu činnosti rozdělují na hladinová a objemová [23]. Hladinové plničky mohou pracovat za atmosférického tlaku, podtlaku nebo přetlaku. Objemové plničky pracují na měření průtoku vína pro přesné dávkování plněného objemu [24].

Dále se láhev uzavře buď korkovým, šroubovacím, korunkovým nebo skleněným uzávěrem, na který se pak dá záklopka [23]. Na láhev se nalepí etiketa a následně se lahve balí do spotřebitelského balení [24].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR VZORKU

Cílem praktické části bylo zjistit mikroflóru hroznu, moštu, moštu během kvašení a mladého vína. K tomu byly použity 2 vzorky jakostních révových vín, z toho jeden vzorek bílého vína (Veltlínské zelené) a jeden vzorek červeného vína (Frankovka). Ve vzorcích se sledoval celkový počet mikroorganismů, octové a mléčné bakterie, kvasinky a plísně.

Vzorek bílého vína: Veltlínské zelené

Původní cukernatost moštu (3. 10. 2015) byla 19,5 °NM, proběhlo doslazení na 22 °NM. Mošt byl zasířen a zakvašen čistou kulturou kvasinek ZYMAFLORE X16. Před koncem kvašení (1. 11. 2015) bylo provedeno zasíření disiřičitanem draselným, následně se víno stáčelo z kalů. Před 2. stáčením (14. 11. 2015) proběhlo čiření čiridlem BLANCOLL a následná filtrace. Víno obsahovalo 11,5 obj. % alkoholu, 13,6 g/l zbytkového cukru a 6,7 g/l kyselin.

Vzorek červeného vína: Frankovka

Po odzrnění hroznů (3. 10. 2015) byla původní cukernatost rmutu 18 °NM. Rmut byl zasířen disiřičitanem draselným, následovalo doslazení moštu na hodnotu 22 °NM. Po nakvašení rmutu proběhlo spontánní kvašení (6. 10. 2015), lisování rmutu (11. 10. 2015). 14. 10. 2015 se víno stáčelo z kalů. Před 2. stáčením (2. 11. 2015) proběhlo čiření přípravkem BLANCOLL a následovala filtrace. Víno obsahovalo 12,5 obj. % alkoholu, 4,1 g/l zbytkového cukru a 5,2 g/l kyselin.

Mikrobiologický rozbor se skládá z několika kroků: odběr a transport vzorku, příprava vzorku k testování (dokumentace, dekontaminace obalů, otevírání, navážení, ředění), kultivace a vyhodnocení výsledků.

Mikrobiologický rozbor byl proveden podle normy ČSN EN ISO 6887-1 (1999): Mikrobiologie potravin a krmiv – Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinasobných ředění – Část 1: Všeobecné pokyny pro přípravu výchozí suspenze a desetinasobných ředění [7].

4.1 Odběr vzorků

Vzorky musí být odebrány tak, aby správně reprezentovaly kontrolovaný materiál. Během odběru vzorků nesmí dojít ke kontaminaci [7].

4.2 Přeprava a uchování vzorků

Vzorky musí být zabezpečeny tak, aby nedošlo ke změnám počtu mikroorganismů. Počet mikroorganismů se nesmí zvýšit, ani snížit. Proto se musí používat sterilní obaly na vzorky, aseptická práce a omezení metabolismu mikroorganismů chlazením. Všechny tyto činnosti se řídí příslušnými pravidly, uvedenými v konkrétních normách. Maximální doba přepravy je 6 hodin při 5°C [7].

4.3 Zpracování vzorků v laboratoři

Zde se nejprve provede prvotní evidence – vzorky se zapíše do laboratorního deníku. Pak následuje analýza [7].

4.3.1 Otevírání obalů vzorků

Při této činnosti musíme zabránit kontaminaci vzorku. Před otevřením obalu se vzorky promíchají desetinásobným převrácením dnem vzhůru nebo kruhovým pohybem. Hrdlo se v místě styku s uzávěrem otře tamponem namočeným v 70 % etanolu a ožehne v plameni. Obal se otevře, hrdlo se znovu opálí a odebere potřebné množství vzorku [7].

4.3.2 Navážka

Objem navážky je konkrétně stanoven v příslušných normách pro určitý výrobek nebo metodou rozboru. Obvykle to bývá 10 g. Pro přímé očkování tekutého vzorku nejméně 1 ml.

Vzorky se odměřují sterilní pipetou z hloubky vzorkovnice. Roztok, který ulpí na povrchu pipety, se nechá stéci k jejímu hrotu a odstraní se otřením o vnitřní stěnu vzorkovnice nad hladinou vzorku [7].

4.3.3 Ředění

Účelem ředění je dosáhnout takové koncentrace mikrobů v inokulu, aby se kolonie, které narostou v naočkovaných půdách, daly dobře spočítat. Příliš nízký i příliš vysoký počet kolonií může být příčinou nepřesného stanovení. Je-li v půdě jen několik kolonií, znamená i malá náhodná odchylka způsobená rozptylem buněk v inokulu, pipetováním

a kontaminací, relativně velkou chybu. Při vysokém počtu jsou kolonie drobné, hustě nahloubené. Mohou srůstat, překrývat se nebo se vzájemně inhibovat. Odečítání je namáhavé a zdlouhavé, snadno dochází k chybám.

Desítkové ředění se zhotoví tak, že se jeden díl nižšího ředění nepipetuje do devíti dílů ředícího roztoku. Vzniklé vyšší ředění se homogenizuje sterilní pipetou, kterou se směs desetkrát nasaje a vypustí, nebo pětadvacetinásobným protřepáním. Každé desítkové ředění obsahuje v 1 ml předcházející ředění [7].

4.3.3.1 Stupeň ředění

Stupeň ředění se určuje podle předpokládaného počtu mikroorganismů. Vychází se z příslušných norem nebo ze zkušenosti tak, aby se celkový počet všech kolonií pohyboval v rozmezí od 30 do 300. Počet kolonií specifických skupin bakterií od 15 do 150, kolonií kvasinek od 15 do 150 a kolonií plísni od 5 do 50.

Existuje-li možnost větší odchylky v počtu mikroorganismů od předpokládané nebo normou stanovené hodnoty a záleží-li na přesném stanovení počtu, očkuje se do pūd několik ředění, obvykle tři za sebou jdoucí. Vedle ředění, které by mělo teoreticky vyhovovat daným podmínkám, se očkuje ještě ředění o stupeň nižší a ředění o stupeň vyšší [7].

4.3.4 Očkování

Při očkování je třeba zvolit množství inokula, stupeň ředění a způsob očkování. Inokulem se rozumí násada mikroorganismů vnesená do živné pūdy. Inokulem může být tekutý vzorek, nebo různé stupně ředění vzorků tekutých i jiné konzistence.

Při očkování přelivem se postupuje tak, že se každé zvolené ředění nepipetuje sterilní pipetou souběžně do dvou prázdných Petriho misek. Očkuje-li se více ředění za sebou, musí být každé naočkováno samostatnou sterilní pipetou. Inokulum v Petriho misce se do 15 minut přelije rozpuštěnou agarovou pūdou vytemperovanou na $(45 \pm 0,5)$ °C v množství (18 ± 2) ml. Agarová vrstva má být silná asi 4 mm. Nalítá pūda se na pracovní desce stolu promíchá krouživými pohyby po a proti směru otáčení hodinových ručiček s inokulem, aby se mikroorganismy dokonale rozptýlily v celém objemu pūdy. S promícháním je třeba začít ihned po nalití a skončit se musí dříve, než začne pūda rosolovatět. Jinak nebude povrch agarové plotny hladký, ale nerovný a zvrásněný až potrhaný. Po promíchání se musí nechat misky s pūdou v klidu, dokud agarová vrstva úplně neztuhne [7].

4.3.5 Kultivace

Naočkované Petriho misky se ukládají do termostatu obrácené dnem vzhůru, zkumavky se staví do košíků.

Doba kultivace záleží na stanovované skupině mikroorganismů a použitém druhu živné půdy. Jestliže je nedostatečná, bývají kolonie příliš malé a mohou být přehlédnuty. Často postrádají morfologické vlastnosti typické pro druh. V diagnostických půdách se při zkrácené kultivaci nestačí rozvinout charakteristické indikátorové reakce. Příliš dlouhá kultivace může vést k přerůstání a srůstání kolonií, k vysychání půdy a k nežádoucím změnám indikátorových reakcí v diagnostických půdách [7].

4.3.6 Odečítání a hodnocení výsledků

Na polotuhých půdách se odečítají vyrostlé kolonie. Při stanovení celkového počtu mikroorganismů se počítají všechny kolonie. Při stanovení určitého druhu, taxonomické nebo funkční skupiny se počítají jen kolonie charakteristických vlastností, typických pro zjišťované mikroorganismy [7].

4.3.6.1 Vzorce pro výpočet výsledků

Nárůst na Petriho miskách byl vyjádřen podle následujících vzorců. Vzorec (1) pro výpočet počtu kolonií ze dvou po sobě následujících ředění.

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d \cdot V} \quad (1)$$

kde

N	počet MO v 1 ml
$\sum c$	počet všech kolonií tvořících jednotek na všech plotnách použitých pro výpočet
n_1	počet ploten prvního ředění použitého pro výpočet
n_2	počet ploten druhého ředění použitého pro výpočet
d	ředicí faktor odpovídající prvnímu pro výpočet použitému ředění
V	objem očkovaného inokula

Vzorec (2) pro výpočet z jednoho ředění

$$N = \frac{m}{d \cdot V} \quad (2)$$

kde

N počet MO v 1ml

m průměrný počet vybraných kolonií

d ředící faktor odpovídající prvnímu pro výpočet použitému ředění

V objem očkovaného inokula

Tento výpočet je méně přesný, proto se musí ve výsledku uvést: odhadnutý počet.

Vzorec (3) pro výpočet vysokých počtů kolonií

$$N = \frac{m}{d \cdot V} \quad (3)$$

kde

N počet MO v 1ml

m průměrný počet vybraných kolonií

d ředící faktor odpovídající nejvyššímu použitému ředění

V objem očkovaného inokula

Tento výpočet je méně přesný, proto se musí ve výsledku uvést: odhadnutý počet

Vzorec (4) pro výpočet nízkých počtů kolonií

$$N = \frac{m}{d \cdot V} \quad (4)$$

kde

N počet MO v 1ml

m průměrný počet vybraných kolonií

d ředící faktor odpovídající nejnižšímu použitému ředění

V objem očkovaného inokula

Tento výpočet je méně přesný, proto se musí ve výsledku uvést: odhadnutý počet.

Vzorec (5) pro výpočet prázdných misek

$$N < \frac{1}{d \cdot V} \quad (5)$$

kde

N počet MO v 1ml

d ředící faktor odpovídající nejnižšímu ředění

V objem očkovaného inokula

Tento výpočet je méně přesný, proto se musí ve výsledku uvést: méně než [32].

5 STANOVENÍ CELKOVÉHO POČTU MIKROORGANISMŮ

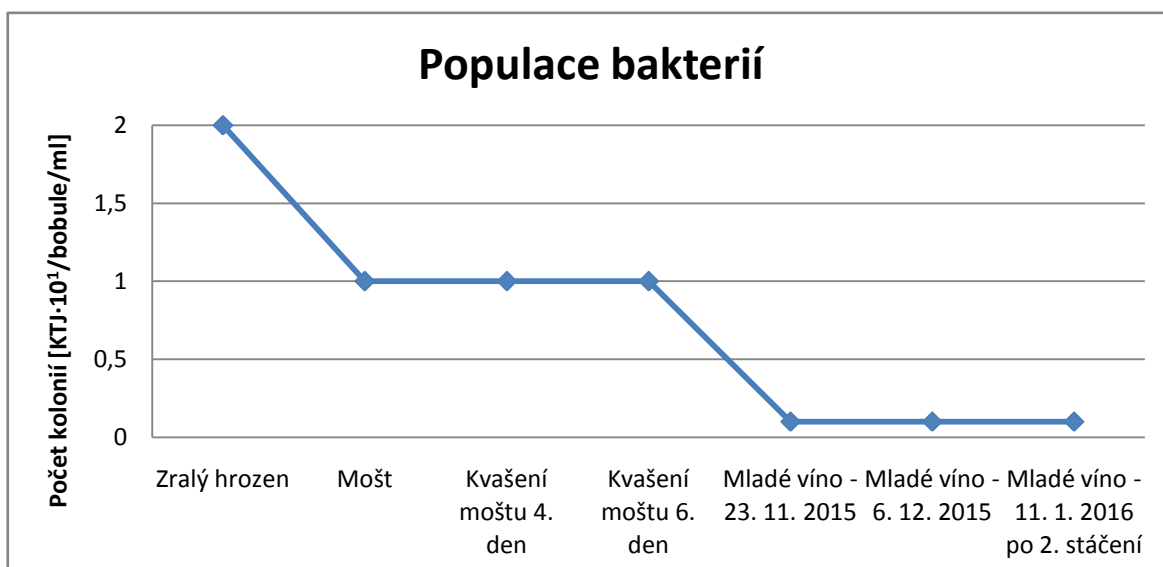
Stanovení bylo provedeno podle normy ČSN ISO 4833 (2003): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C.

CPM považujeme za základní, obecnou informaci o mikrobiální kontaminaci vzorku. Tato hodnota nás informuje o stupni mikrobiální kontaminace, kvalitě surovin, dodržování hygieny a technologie.

Ke stanovení se používá živná půda GTK. Obsahuje glukosu (substrát, zdroj energie a uhlíku), trypton (enzymatický hydrolyzát kaseinu, zdroj dusíku, aminokyselin a uhlíku) a kvasničný extrakt (růstové faktory). Je to kolektivní živná půda ke stanovení CPM, očkuje se přelivem, kultivace 30 °C 72 hod., dosušuje se při 50 °C 30 minut, počítají se všechny kolonie [7].

Tab. 1. Výsledky populace bakterií během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené

VZOREK	KTJ/bobule KTJ/ml
Zralý hrozen	$2 \cdot 10^1$
Mošt	$< 1 \cdot 10^1$
Kvašení moštu 4. den	$< 1 \cdot 10^1$
Kvašení moštu 6. den	$< 1 \cdot 10^1$
Mladé víno – 23. 11. 2015	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 6. 12. 2015	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 11. 1. 2016 po 2. stáčení	$< 1 \cdot 10^0$

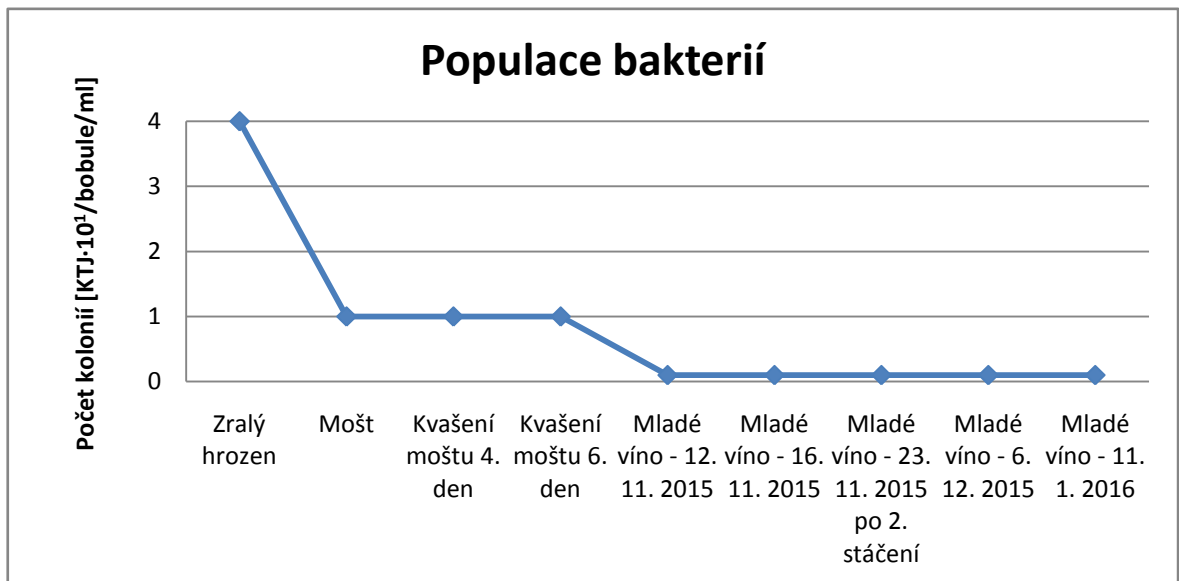


Graf 1. Průběh růstu populace bakterií během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené

Během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené byly bakterie přítomny pouze na zralém hroznu jako součást přirozené mikroflóry. Po odzrnění a lisování byl mošt zasířen disiřičitanem draselným, který slouží jako protibakteriální činidlo, čímž se utlumila jejich aktivita. V průběhu zrání mladého vína bakterie nebyly zjištěny, což svědčí o dobré technologii a hygieně sklepa.

Tab. 2. Výsledky populace bakterií během výroby červeného vína odrůdy Frankovka

VZOREK	KTJ/bobule KTJ/ml
Zralý hrozen	$4 \cdot 10^1$
Mošt	$< 1 \cdot 10^1$
Kvašení moštu 4. den	$< 1 \cdot 10^1$
Kvašení moštu 6. den	$< 1 \cdot 10^1$
Mladé víno – 12. 11. 2015	$< 1 \cdot 10^1$
Mladé víno – 16. 11. 2015	$< 1 \cdot 10^1$
Mladé víno – 23. 11. 2015 po 2. stáčení	$< 1 \cdot 10^1$
Mladé víno – 6. 12. 2015	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 11. 1. 2016	$< 1 \cdot 10^0$



Graf 2. Průběh růstu populace bakterií během výroby červeného vína odrůdy Frankovka

Během výroby červeného vína odrůdy Frankovka byly bakterie ve větší míře zastoupeny pouze na zralém hroznu. Během kvašení došlo k jejich útlumu, v mladém víně nebyl jejich výskyt zaznamenán. Hrozny po odzrnutí a rmut byl opět zasířen, čímž došlo k jejich účinnému potlačení.

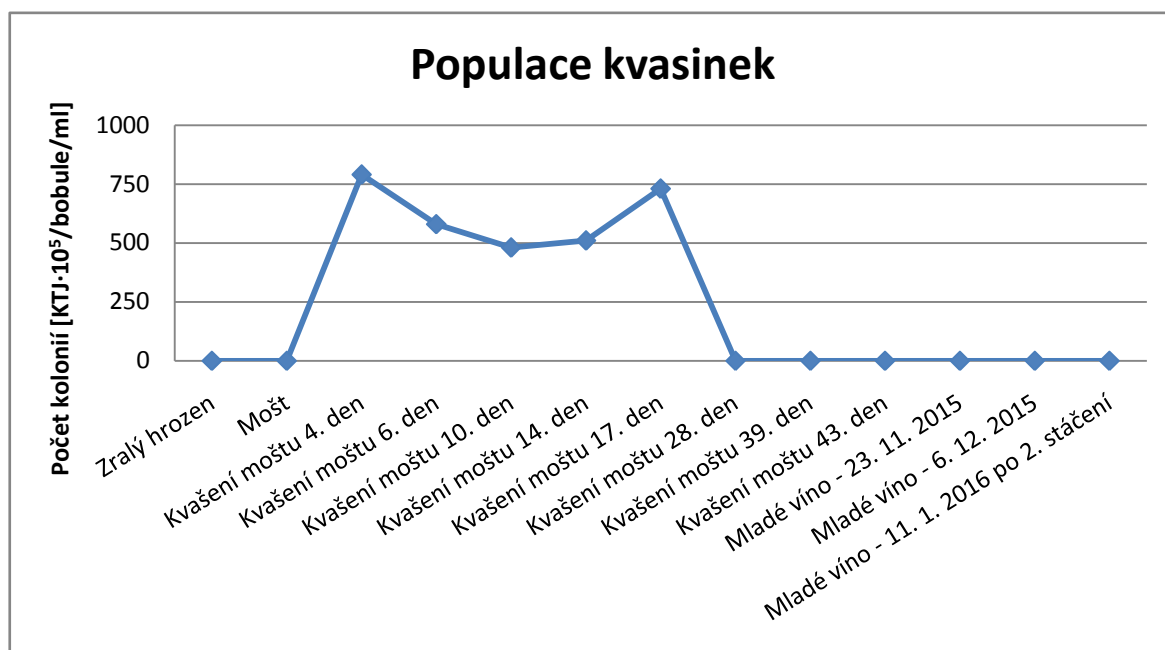
6 STANOVENÍ PLÍSNÍ A KVASINEK

Stanovení bylo provedeno podle normy ČSN ISO 21527-1 (2009): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní – Část 1: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody vyšší než 0,95.

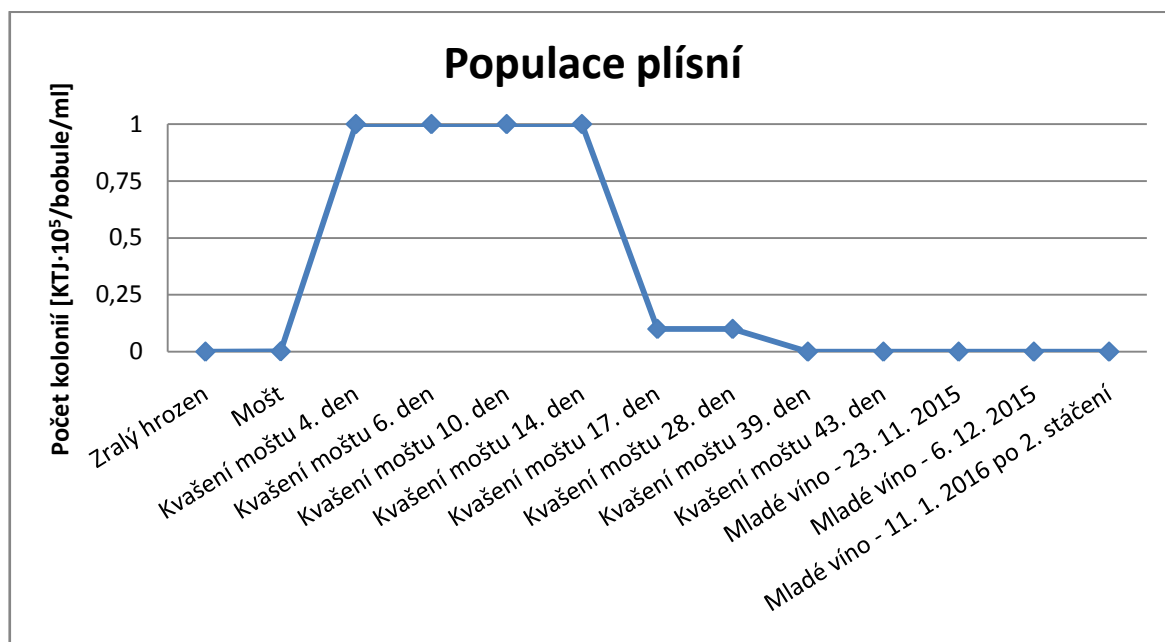
Ke stanovení se používá živná půda GKCH obsahuje glukosu (substrát, zdroj energie a uhlíku), kvasničný extrakt (enzymatický hydrolyzát kaseinu, zdroj dusíku, aminokyselin a uhlíku) a chloramfenikol (selektivní činidlo, potlačí bakterie). Je to selektivní živná půda ke stanovení kvasinek a plísní, očkuje se přelivem, nedosušuje se, kultivace 30 °C (25 °C), 3-5 dnů, odečítá se 3. den a končí se 5. den. Kvasinky a plísně se počítají zvlášť [7].

Tab. 3. Výsledky populace plísní a kvasinek během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené

VZOREK	Kvasinky KTJ/bobule KTJ/ml	Plísně KTJ/bobule KTJ/ml
Zralý hrozen	$1,6 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^1$
Mošt	$8 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^2$
Kvašení moštu 4. den	$7,9 \cdot 10^7$	$< 1 \cdot 10^5$
Kvašení moštu 6. den	$5,8 \cdot 10^7$	$< 1 \cdot 10^5$
Kvašení moštu 10. den	$4,8 \cdot 10^7$	$< 1 \cdot 10^5$
Kvašení moštu 14. den	$5,1 \cdot 10^7$	$< 1 \cdot 10^5$
Kvašení moštu 17. den	$7,3 \cdot 10^7$	$< 1 \cdot 10^4$
Kvašení moštu 28. den	$6,1 \cdot 10^3$	$< 1 \cdot 10^4$
Kvašení moštu 39. den	$2,2 \cdot 10^2$	$< 1 \cdot 10^0$
Kvašení moštu 43. den	$4,2 \cdot 10^1$	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 23. 11. 2015	$< 1 \cdot 10^0$	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 6. 12. 2015	$< 1 \cdot 10^0$	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 11. 1. 2016 po 2. stáčení	$< 1 \cdot 10^0$	$< 1 \cdot 10^0$



Graf 3. Průběh růstu populace kvasinek během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené



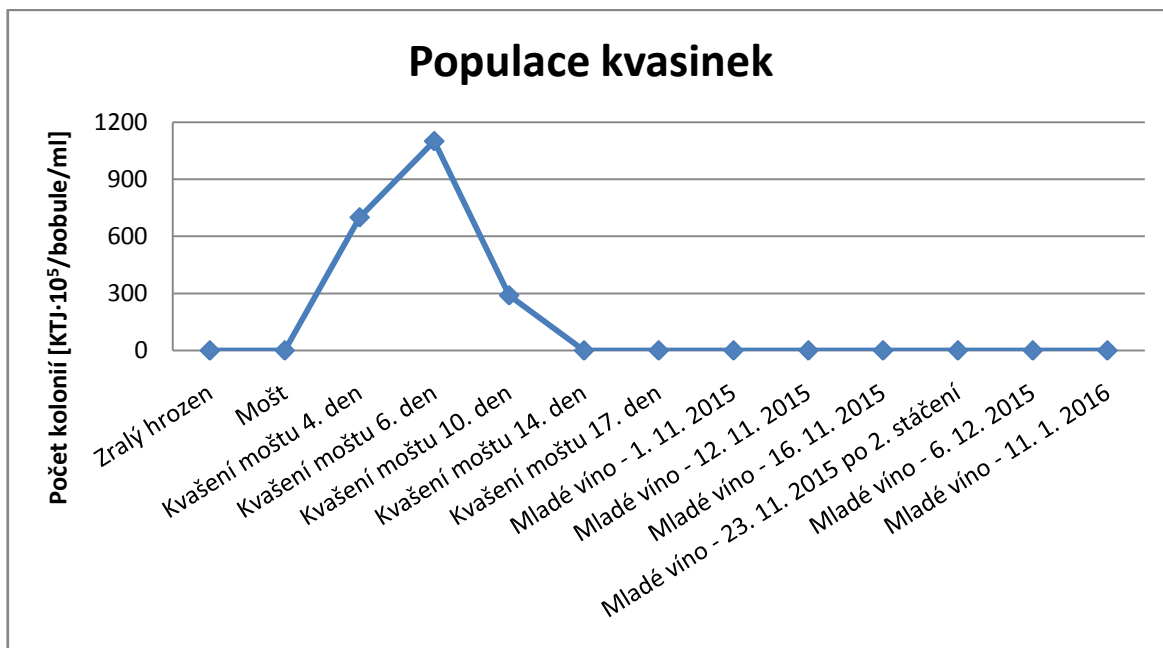
Graf 4. Průběh růstu populace plísni během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené

Během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené se na zralém hroznu vyskytovaly kvasinky, které jsou součástí přirozené mikroflóry. Předpokládáme, že se jedná především o apikulátní kvasinky schopné zahájit spontánní kvašení. Do moštu byla přidána čistá kultura ušlechtilých vinných kvasinek, která pak byla odpovědná za hlavní kvašení a dokvašení. Na konci alkoholového kvašení začíná počet kvasinek klesat, protože začínají být inhibovány dostatečným množstvím vzniklého ethanolu.

Plísně byly přítomny ve větším množství v moštu z důvodu postižení hroznů. Během kvašení se postupně jejich zastoupení snižovalo. Mošt byl zasířen disiřičitanem draselným, který účinně potlačuje bakterie a plísně.

Tab. 4. Výsledky populace plísni a kvasinek během výroby červeného vína odrůdy Frankovka

VZOREK	Kvasinky KTJ/bobule KTJ/ml	Plísně KTJ/bobule KTJ/ml
Zralý hrozen	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^1$
Mošt	$2,8 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^2$
Kvašení moštu 4. den	$7 \cdot 10^7$	$< 1 \cdot 10^5$
Kvašení moštu 6. den	$1,1 \cdot 10^8$	$< 1 \cdot 10^5$
Kvašení moštu 10. den	$2,9 \cdot 10^7$	$< 1 \cdot 10^4$
Kvašení moštu 14. den	$3,2 \cdot 10^1$	$< 1 \cdot 10^0$
Kvašení moštu 17. den	$< 1 \cdot 10^0$	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 1. 11. 2015	$< 1 \cdot 10^0$	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 12. 11. 2015	$< 1 \cdot 10^0$	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 16. 11. 2015	$< 1 \cdot 10^0$	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 23. 11. 2015 po 2. stáčení	$< 1 \cdot 10^0$	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 6. 12. 2015	$< 1 \cdot 10^0$	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 11. 1. 2016	$< 1 \cdot 10^0$	$< 1 \cdot 10^0$



Graf 5. Průběh růstu populace kvasinek během výroby červeného vína odrůdy Frankovka



Graf 6. Průběh růstu populace plísní během výroby červeného vína odrůdy Frankovka

Během výroby červeného vína odrůdy Frankovka se na zralém hroznu vyskytovaly kvasinky, které jsou součástí přirozené mikroflóry. Při mletí se kvasinky přenesly z bobulí hroznů do moštu a zároveň došlo k přenosu ušlechtilých kvasinek ze zařízení. Nakvácení rmutu a následné kvašení proběhlo spontánním způsobem. V době bouřlivého kvašení dominuje přítomnost kvasinek. Na konci alkoholového kvašení začíná počet kvasinek klesat. Plísně byly přítomny v moštu z důvodu poškození hroznů. Během kvašení již nebyly přítomny, mošt byl zasažen disiřičitanem draselným, který účinně potlačuje bakterie a plísně.

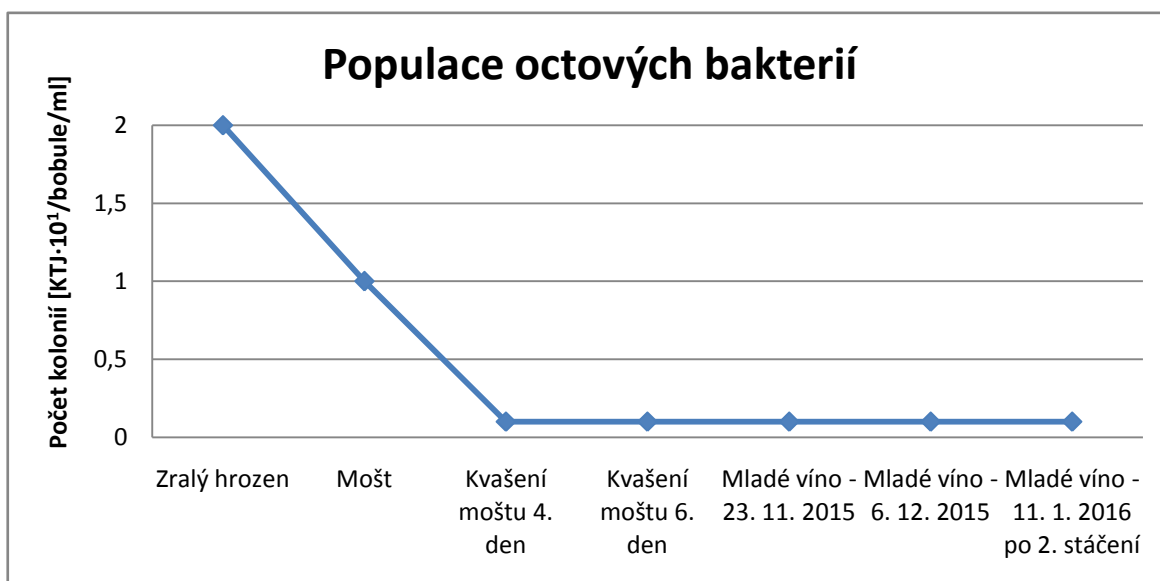
7 STANOVENÍ OCTOVÝCH BAKTERIÍ

Metabolizují etanol na kyselinu octovou v přítomnosti kyslíku. Stanovují se na živné půdě Acetobacter agar. Očkuje se přelivem, kultivace 30 °C 72 hod., nedosuší se.

Živná půda ACA obsahuje kvasničný extrakt, příp. hydrolyzát živočišné tkáně (zdroj dusíku vitamínů a minerálů nezbytných pro jejich růst), glukosu (zdroj uhlíku a energie), uhličitan vápenatý (pufr). Vznikající kyselina octová rozkládá uhličitan vápenatý, takže pod koloniemi se tvoří jasná zóna. Konečné pH se upraví na hodnotu $7,4 \pm 0,2$ [7].

Tab. 5. Výsledky populace octových bakterií během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené

VZOREK	KTJ/bobule KTJ/ml
Zralý hrozen	$2 \cdot 10^1$
Mošt	$< 1 \cdot 10^1$
Kvašení moštu 4. den	$< 1 \cdot 10^0$
Kvašení moštu 6. den	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 23. 11. 2015	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 6. 12. 2015	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 11. 1. 2016 po 2. stáčení	$< 1 \cdot 10^0$

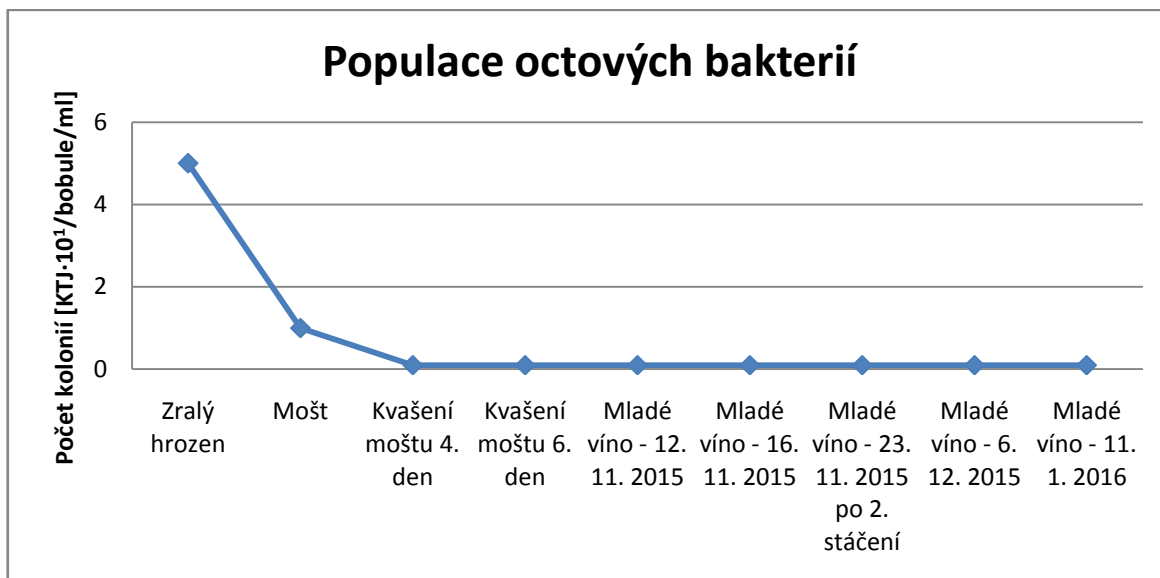


Graf 7. Průběh růstu populace octových bakterií během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené

Octové bakterie byly přítomny pouze na zralém hroznu. Během kvašení nebyly přítomny, protože se mošt před zakvašením dostatečně zasiřil a tím se zamezilo jejich růstu. V mladém víně také nebyly přítomny, což ukazuje na správnou technologii a hygienu sklepa.

Tab. 6. Výsledky populace octových bakterií během výroby červeného vína odrůdy Frankovka

VZOREK	KTJ/bobule KTJ/ml
Zralý hrozen	$5 \cdot 10^1$
Mošt	$< 1 \cdot 10^1$
Kvašení moštu 4. den	$< 1 \cdot 10^0$
Kvašení moštu 6. den	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 12. 11. 2015	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 16. 11. 2015	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 23. 11. 2015 po 2. stáčení	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 6. 12. 2015	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 11. 1. 2016	$< 1 \cdot 10^0$



Graf 8. Průběh růstu populace octových bakterií během výroby červeného vína odrůdy Frankovka

Během výroby červeného vína odrůdy Frankovka byly octové bakterie přítomny pouze na zralém hroznu, kdy využívají kyslík ke svému růstu. Během kvašení nebyly přítomny, protože se mošt před zakvašením dostatečně zasiřil a tím se zamezil vývin octových bakterií. V mladém víně také nebyly přítomny, což je dobře, protože by mohly způsobovat kontaminace.

8 STANOVENÍ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

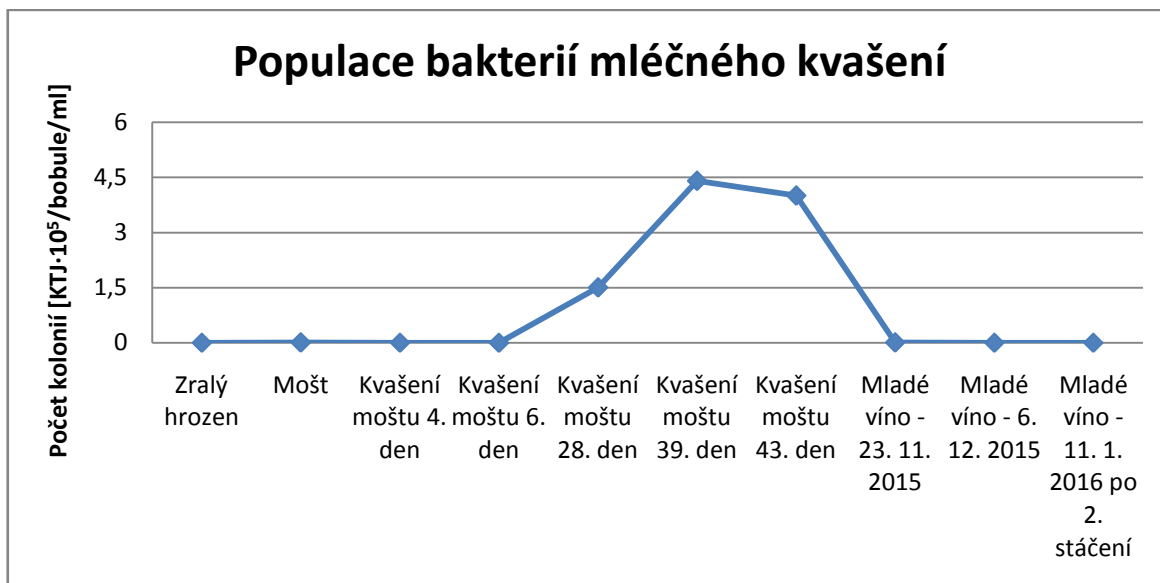
Stanovení bylo provedeno podle normy ČSN ISO 15214 (2000): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu mezofilních bakterií mléčného kvašení – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C.

Stanovují se na živné půdě MRS agar. Očkuje se přelivem, kultivace 30 °C 72 hod., nedosuší se.

Živná půda MRS agar obsahuje pepton, masový extrakt, kvasničný extrakt, glukosa, Tween (snižuje povrchové napětí), hydrogenfosforečnan draselný, octan sodný, citran amonný, síran hořečnatý, síran manganatý a agar [7].

Tab. 7. Výsledky populace bakterií mléčného kvašení během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené

VZOREK	KTJ/bobule KTJ/ml
Zralý hrozen	$< 1 \cdot 10^1$
Mošt	$2,25 \cdot 10^2$
Kvašení moštu 4. den	$< 1 \cdot 10^0$
Kvašení moštu 6. den	$< 1 \cdot 10^0$
Kvašení moštu 28. den	$1,5 \cdot 10^5$
Kvašení moštu 39. den	$4,4 \cdot 10^5$
Kvašení moštu 43. den	$4 \cdot 10^5$
Mladé víno – 23. 11. 2015	$8,6 \cdot 10^1$
Mladé víno – 6. 12. 2015	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 11. 1. 2016 po 2. stáčení	$< 1 \cdot 10^0$



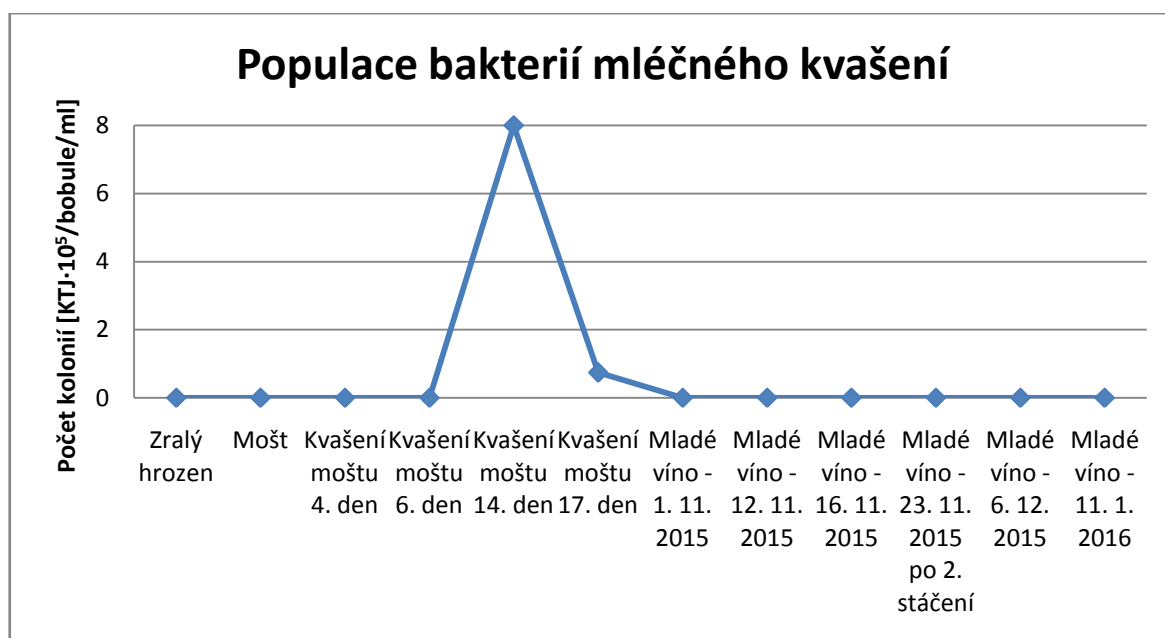
Graf 9. Průběh růstu populace bakterií mléčného kvašení během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené

Během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené byly přítomny bakterie mléčného kvašení, které jsou důležité pro biologické odbourávání kyselin. Jejich populace na hroznu je nízká, k rozvoji dochází až v pozdějších fázích kvašení. Během alkoholového kvašení nebyly přítomny, dominující mikroflórou se staly kvasinky. BMK jsou přítomny až po alkoholovém kvašení, kdy nastává jablečno-mléčná fermentace. V průběhu jablečno-mléčné fermentace byla použita živná půda MRSAgar s actidionem pro potlačení růstu kvasinek.

Tab. 8. Výsledky populace bakterií mléčného kvašení během výroby červeného vína odrůdy Frankovka

VZOREK	KTJ/bobule KTJ/ml
Zralý hrozen	$< 1 \cdot 10^1$
Mošt	$2,9 \cdot 10^2$
Kvašení moštu 4. den	$< 1 \cdot 10^0$
Kvašení moštu 6. den	$< 1 \cdot 10^0$
Kvašení moštu 14. den	$8 \cdot 10^5$
Kvašení moštu 17. den	$7,4 \cdot 10^4$

Mladé víno – 1. 11. 2015	$4 \cdot 10^0$
Mladé víno – 12. 11. 2015	$2 \cdot 10^0$
Mladé víno – 16. 11. 2015	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 23. 11. 2015 po 2. stáčení	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 6. 12. 2015	$< 1 \cdot 10^0$
Mladé víno – 11. 1. 2016	$< 1 \cdot 10^0$



Graf 10. Průběh růstu populace bakterií mléčného kvašení během výroby červeného vína odrůdy Frankovka

Během výroby červeného vína odrůdy Frankovka byly přítomny bakterie mléčného kvašení na hroznu, během alkoholového kvašení nebyly přítomny, dominující mikroflórou se staly kvasinky. Počet mléčných bakterií se zvýšil ve fázi dokvašení, kdy nastupuje biologické odbourávání kyselin, které je zvláště u červených vín důležité. Odbourávání kyselin proběhlo spontánním způsobem. V průběhu jablečno-mléčné fermentace byla použita živná půda MRSAgar s actidionem pro potlačení růstu kvasinek.

ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývá výskytem mikroorganismů v průběhu výroby vína. K mikrobiálnímu rozboru byly použity 2 vzorky jakostních révových vín, vzorek bílého vína (Veltlínské zelené) a vzorek červeného vína (Frankovka) z vinice z Velkopavlovické oblasti. Ve vzorcích byl sledován celkový počet mikroorganismů, octové a mléčné bakterie, kvasinky a plísňe. Vzorky se odebíraly dle jednotlivých fází výroby vína.

Teoretická část je zaměřena především na mikroflóru bobulí hroznu, moštu a vína. Dále je popsána stavba hroznu, bobule a technologie výroby vína.

V praktické části jsou popsány metody, které byly použity při mikrobiologickém rozboru bobulí hroznu, moštu a vína. Získané výsledky byly zpracovány do tabulek a grafů.

U odrůdy Veltlínské zelené byly na zralém hroznu přítomny bakterie, kvasinky a plísňe, které se na hrozen dostaly z půdy, vzduchu, listů a tvořili přirozenou mikroflóru pocházející z vinice, která odpovídala zdravotnímu stavu hroznu a je původcem spontánního kvasného procesu. Pro zahájení kvašení je nejdůležitější přítomnost kvasinek, jejichž počet nedosahoval hodnot uváděných v literatuře. Tato skutečnost je způsobena mnoha faktory, od povětrnostních vlivů až po ošetřování vinic fungicidními přípravky proti plísni. Proto je nutné nahodilost spontánního procesu kvašení nahradit užitím čisté kultury kvasinek. Zastoupení bakterií a plísni se postupně v průběhu kvašení snižovalo, což je spojené s rozvojem ušlechtilých vinných kvasinek v průběhu kvašení a šířením, které účinně potlačuje rozvoj bakterií a plísni.

U vzorku červeného vína odrůdy Frankovka byla na zralém hroznu zjištěna přítomnost přirozené mikroflóry kvasinek, bakterií a plísni. Hodnoty byly opět nižší, než je uváděno v literatuře. V průběhu kvašení rmutu nastoupilo spontánní kvašení a ve fázi dokvašení proběhlo spontánní biologické odbourávání kyselin. Populace bakterií a plísni v průběhu kvašení ustoupila. Ve fázi dokvašení se zvýšil počet bakterií mléčného kvašení, které odbourávají kyselinu jablečnou na sensoricky přijatelnější kyselinu mléčnou.

Výroba vína je velmi složitý proces, který je úzce spjatý jak s kvalitou suroviny, tak mikrobiálním osídlením, tak v neposlední řadě i se zkušenostmi vinohradníka a vinaře. Proto je nutné dbát zvýšené opatrnosti už při přípravě suroviny a případně včas zasáhnout do procesu, aby výsledný produkt nebyl znehodnocen a dosahoval kvalit vhodných pro zákazníka. Jednou z nejdůležitějších podmínek je hladké a čisté kvašení pomocí zdravé

mikroflóry. Ta je bohužel často oslabena nebo znehodnocena nepříznivými klimatickými podmínkami, s čímž souvisí i používání přípravků na ochranu vinic. Proto je v dnešní době často nutné používat čisté kultury kvasinek k zajištění hladkého průběhu kvašení.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [6] KRAUS, Vilém. *Nová encyklopedie českého a moravského vína*. Praha: Praga Mystica, 2005-2008, 2 v. ISBN 97880867670932.
- [2] FIC, Vlastimil. *Sborník aplikačních postupů: víno - analýza, technologie výroby, gastronomie*. 1. vyd. Český Těšín: 2 Theta, 2014, 126 s. ISBN 978-80-86380-71-1.
- [3] FARKAŠ, J.: *Biotechnológia vína*. Bratislava: Alfa, 1983. s. 210-280.
- [4] MINÁRIK, Erich. *Chémia a mikrobiológia vína*. 1. vyd. Bratislava: Príroda, 1986, 547 s.
- [5] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA. ISBN 80-200-1024-6.
- [6] ŠVĚJCAR, Václav a Erich MINÁRIK. *Vinařství : Mikrobiologie hroznů a vína*. 1981.
- [7] CUPÁKOVÁ, Šárka, Renáta KARPÍŠKOVÁ a Lenka NECIDOVÁ. *Mikrobiologie potravin - praktická cvičení II.: metody stanovení mikroorganismů v potravinách*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2010. ISBN 978-80-7305-126-6.
- [8] MALÍK, Fedor a MINÁRIK. *Liehovarníctvo, Droždiarstvo, Vinárstvo : Vinárstvo*. 1. vyd. Bratislava, 1983.
- [9] RIBÉREAU-GAYON, Pascal, Denis DUBOURDIEU a Bernard DONÈCHE. *Handbook of enology*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, c2006-, 2 v. ISBN 04-700-1037-1.
- [10] DICKS, L. M. T.; ENDO, A. Taxonomic Status of Lactic Acid Bacteria in Wine and Key Characteristics to Differentiate Species. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2009, 30, 1, s. 72-90.
- [11] FUGELSANG, K a Charles G EDWARDS. *Wine microbiology*. 2nd ed. /. New York, NY: Springer, c2007, xx, 393 p. ISBN 03-873-3349-5.
- [12] KÖNIG, Helmut, Gottfried UNDEN a Jürgen FRÖHLICH . *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. 2nd ed. /. Berlin: Springer, c2009, xviii, 522 p. ISBN 978-3-540-85462-3.

- [13] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Mikrobiologie v technologii vod*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008, 252 s. ISBN 978-80-7080-676-0.
- [14] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo Alfa, 1990, 699 s., [72] s. obr. příl. Edícia potravinárskej literatúry. ISBN 80-050-0644-6.
- [15] PÁTEK, Jaroslav. *Nová vinařská abeceda*. 1. vyd. Brno: Blok, 1995, 183 s. ISBN 80-702-9095-1.
- [16] PAVLOUŠEK, Pavel. *Výroba vína u malovinařů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 96 s. ISBN 80-247-1247-4.
- [17] ACKERMANN, Petr. *Metodiky ochrany zahradních plodin pro zahradníky a zahrádkáře*. 3., přeprac. a rozš. vyd. Praha: Květ, 1998, 303 s. ISBN 80-853-6236-8.
- [18] LAHO, L.; MINÁRIK, E. *Vinárstvo II : Chémia, mikrobiológia, analytika vína*. 1. vyd. Bratislava : Slovenské nakladateľství technickej literatúry, n.p., 1959. 312 s.
- [19] BURDA, Alexandr. *O víně*. Vyd. 1. Opava [i.e. Praha]: Carter/reproplus, 2013, 107 s. ISBN 978-80-87613-01-6.
- [20] SIMON, Joanna. *O víně*. Vyd. 3. Překlad Lenka Svobodová. Praha: Slovart, 2013, 224 s. ISBN 978-80-7391-819-4.
- [21] PAVLOUŠEK, Pavel. *Výroba vína u malovinařů*. 2., aktualiz. a rozš. vyd. Praha: Grada, 2010, 120 s., [8] s. barev. obr. příl. ISBN 978-80-247-3487-3.
- [22] BAROŇ, Mojmír. *Možnosti snížení obsahu oxidu siřičitého v technologii révo-vých vín: Possibilities of sulfur dioxide reduction [i.e. reduction] in wine technology : původní vědecká práce*. Vyd. 1. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2013, 50 s. Folia Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. ISBN 978-80-7375-924-7.
- [23] BURG, Patrik a Pavel ZEMÁNEK. *Technika pro vinařství*. 1. vyd. V Brně: Mendelova univerzita, 2013, 148 s. ISBN 978-80-7375-910-0.
- [24] BURG, Patrik a Pavel ZEMÁNEK. *Stroje a zařízení pro vinařství*. 1. vyd. Olomouc: Agriprint, 2014, 254 s. ISBN 978-80-87091-49-4.
- [25] PÁTEK, Jaroslav a Pavel ZEMÁNEK. *Stroje a zařízení pro vinařství*. 1. vyd. Olomouc: Agriprint, 2014, 254 s. ISBN 80-721-7137-2.
- [26] SEDLO, Jiří a Ivana LUDVÍKOVÁ. *Přehled odrůd révy 2014*. Velké Bílovice. ISBN 978-80-903534-7-3.

- [27] MINÁRIK, E., ŠVEJCAR, V.: *Vinařství : Mikrobiologie hroznů a vína*. 2. vyd. Brno: Ediční středisko VŠZ, 1981. s. 3-90.
- [28] PAVLOUŠEK, Pavel. *Pěstování révy vinné: moderní vinohradnictví*. Praha: Grada, c2011, 333 s. ISBN 978-80-247-3314-2.
- [29] *Primat.cz* [online]. 2008 [cit. 2016-03-26]. Dostupné z: <http://www.primat.cz/vscht/predmety/vinarstvi-vyroba-nizkoalkoholickych-anealkoholickych-napoju-q6581/prednasky-m14728/>
- [30] *TrhVín.cz: Portál znalce vína* [online]. 2009 [cit. 2016-03-26]. Dostupné z: <http://www.trhvin.cz/pruvodce-vinem/217-slozeni-hroznu>
- [31] *Viry a bakterie* [online]. [cit. 2016-03-26]. Dostupné z: <http://viry-bakterie.wz.cz/bakterie.htm>
- [32] ČERNÍKOVÁ, Michaela a Zuzana MÍŠKOVÁ. *Praktická cvičení z potravinářské mikrobiologie*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010. ISBN 978-80-7318-749-1.
- [33] *Miniatlas mikroorganismů* [online]. 2006 [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/asp-ni.htm>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

%	Procento
°C	Stupeň Celsia
°NM	Stupeň normalizovaného moštoměru
ACA	Acetobacter agar
BMK	Bakterie mléčného kvašení
CPM	Celkový počet mikroorganismů
ČSN	Česká technická norma
EN	Evropská norma
g/l	Gram na litr
H.	Hanseniaspora
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
kg	Kilogram
KTJ/ml	Kolonie tvořící jednotku na mililitr
mg/l	Miligram na litr
ml	Mililitr
mm	Milimetr
např.	Například
obj. %	Objemová procenta
P.	Pichia
pH	Záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů v roztoku
ř.	Ředění
S.	Saccharomyces
Sch.	Schizosaccaromyces
Tzv.	Takzvaný

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Stavba hroznu [30]</i>	13
<i>Obr. 2. Průřez bobule [29]</i>	13
<i>Obr. 3. Tvary bakterií [31]</i>	16
<i>Obr. 4. Tvar plísně <i>Aspergillus niger</i> [33]</i>	28

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Výsledky populace bakterií během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené</i>	42
<i>Tab. 2. Výsledky populace bakterií během výroby červeného vína odrůdy Frankovka</i>	43
<i>Tab. 3. Výsledky populace plísní a kvasinek během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené</i>	45
<i>Tab. 4. Výsledky populace plísní a kvasinek během výroby červeného vína odrůdy Frankovka</i>	47
<i>Tab. 5. Výsledky populace octových bakterií během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené</i>	49
<i>Tab. 6. Výsledky populace octových bakterií během výroby červeného vína odrůdy Frankovka</i>	50
<i>Tab. 7. Výsledky populace bakterií mléčného kvašení během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené</i>	52
<i>Tab. 8. Výsledky populace bakterií mléčného kvašení během výroby červeného vína odrůdy Frankovka</i>	53

SEZNAM GRAFŮ

<i>Graf 1. Průběh růstu populace bakterií během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené</i>	43
<i>Graf 2. Průběh růstu populace bakterií během výroby červeného vína odrůdy Frankovka</i>	44
<i>Graf 3. Průběh růstu populace kvasinek během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené</i>	46
<i>Graf 4. Průběh růstu populace plísní během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené</i>	46
<i>Graf 5. Průběh růstu populace kvasinek během výroby červeného vína odrůdy Frankovka</i>	48
<i>Graf 6. Průběh růstu populace plísní během výroby červeného vína odrůdy Frankovka</i>	48
<i>Graf 7. Průběh růstu populace octových bakterií během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené</i>	50
<i>Graf 8. Průběh růstu populace octových bakterií během výroby červeného vína odrůdy Frankovka</i>	51
<i>Graf 9. Průběh růstu populace bakterií mléčného kvašení během výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené</i>	53
<i>Graf 10. Průběh růstu populace bakterií mléčného kvašení během výroby červeného vína odrůdy Frankovka</i>	54

SEZNAM PŘÍLOH

P I Počty kolonií na živných půdách

PŘÍLOHA P I: POČTY KOLONIÍ NA ŽIVNÝCH PŮDÁCH

V P I jsou uvedeny přesné počty kolonií z jednotlivých fází výroby vína. Tabulky znázorňují počet kolonií u celkového počtu mikroorganismů, plísní, kvasinek, bakterií mléčného kvašení a octových bakterií.

Tabulka počtu kolonií na zralém hroznu

Veltlínské zelené

živná půda	1. ředění		2. ředění	
	1. miska	2. miska	1. miska	2. miska
GTK	3 bakterie	1 bakterie	0	0
GKCH	25 kvasinek, 2 plísně	6 kvasinek	0	0
MRS	0	0	0	0
ACA	1 bakterie	3 bakterie	0	2 bakterie

Frankovka

živná půda	1. ředění		2. ředění	
	1. miska	2. miska	1. miska	2. miska
GTK	6 bakterií	2 bakterie	1 bakterie	0
GKCH	10 kvasinek, 1 plíseň	7 kvasinek, 1 plíseň	4 kvasinky	0
MRS	0	0	0	0
ACA	0	1 octová bakterie	0	1 octová bakterie

Tabulka počtu kolonií v moštu

Vetlinské zelené

živná půda	1. ředění		2. ředění		3. ředění	
	1. miska	2. miska	1. miska	2. miska	1. miska	2. miska
GTK	0	0	0	0	0	0
GKCH	20 plísni	23 plísni	8 plísni, 18 kvasinek	6 plísni	7 kvasinek	9 kvasinek
MRS	20 bakterií	25 bakterií	0	0	0	0
ACA	0	0	0	0	0	0

Frankovka

živná půda	1. ředění		2. ředění		3. ředění	
	1. miska	2. miska	1. miska	2. miska	1. miska	2. miska
GTK	0	0	0	0	0	0
GKCH	33 plísni, 534 kvasinek	21 plísni, 557 kvasinek	8 plísni, 280 kvasinek	8 plísni, 284 kvasinek	0	1 plíseň
MRS	30 bakterií	28 bakterií	0	0	0	0
ACA	0	0	0	0	0	0

Tabulka počtu kolonií v moštu – 4. den kvašení

Vetlinské zelené

GTK	1. ředění	2. ředění
1. miska	0	0
2. miska	0	0

GKCH	5. ředění	6. ředění	7. ředění
1. miska	336 kvasinek	81 kvasinek	11 kvasinek
2. miska	259 kvasinek	74 kvasinek	8 kvasinek

MRS	0. ředění	1. ředění	2. ředění
1. miska	0	0	0
2. miska	0	0	0

ACA	0. ředění	1. ředění	2. ředění
1. miska	0	0	0
2. miska	0	0	0

Frankovka

GTK	1. ředění	2. ředění
1. miska	0	0
2. miska	0	0

GKCH	5. ředění	6. ředění	7. ředění
1. miska	296 kvasinek	170 kvasinek	9 kvasinek
2. miska	304 kvasinek	131 kvasinek	8 kvasinek

MRS	0. ředění	1. ředění	2. ředění
1. miska	0	0	0
2. miska	0	0	0

ACA	0. ředění	1. ředění	2. ředění
1. miska	0	0	0
2. miska	0	0	0

Tabulka počtu kolonií v moštu – 6. den kvašení

Vetlinské zelené

GTK	1. ředění	2. ředění	3. ředění
1. miska	0	0	0
2. miska	0	0	0

GKCH	5. ředění	6. ředění	7. ředění
1. miska	237 kvasinek	53 kvasinek	12 kvasinek
2. miska	215 kvasinek	57 kvasinek	8 kvasinek

MRS	0. ředění	1. ředění	2. ředění
1. miska	0	0	0
2. miska	0	0	0

ACA	0. ředění	1. ředění	2. ředění
1. miska	0	0	0
2. miska	0	0	0

Frankovka

GTK	1. ředění	2. ředění	3. ředění
1. miska	0	0	0
2. miska	0	0	0

GKCH	5. ředění	6. ředění	7. ředění
1. miska	288 kvasinek	101 kvasinek	12 kvasinek
2. miska	263 kvasinek	104 kvasinek	20 kvasinek

MRS	0. ředění	1. ředění	2. ředění
1. miska	0	0	0
2. miska	0	0	0

ACA	0. ředění	1. ředění	2. ředění
1. miska	0	0	0
2. miska	0	0	0

Tabulka počtu kolonií v moštu – 10. den kvašení

Veltlínské zelené

GKCH	5. ředění	6. ředění	7. ředění
1. miska	724 kvasinek	79 kvasinek	28 kvasinek
2. miska	654 kvasinek	75 kvasinek	20 kvasinek

Frankovka

GKCH	4. ředění	5. ředění	6. ředění
1. miska	1548 kvasinek	208 kvasinek	35 kvasinek
2. miska	872 kvasinek	186 kvasinek	23 kvasinek

Tabulka počtu kolonií v moštu – 14. den kvašení

Vetlinské zelené

GKCH	5. ředění	6. ředění	7. ředění
1. miska	393 kvasinek	53 kvasinek	6 kvasinek
2. miska	306 kvasinek	49 kvasinek	7 kvasinek

Frankovka

GKCH	0. ředění	1. ředění	2. ředění
1. miska	28 kvasinek	8 kvasinek	0
2. miska	36 kvasinek	4 kvasinky	0

MRSA	3. ředění	4. ředění	5. ředění
1. miska	472 bakterií	100 bakterií	8 bakterií
2. miska	332 bakterií	60 bakterií	9 bakterií

Tabulka počtu kolonií v moštu – 17. den kvašení

Vetlinské zelené

GKCH	4. ředění	5. ředění	6. ředění
1. miska	960 kvasinek	460 kvasinek	82 kvasinek
2. miska	1335 kvasinek	432 kvasinek	63 kvasinek

Frankovka

GKCH	0. ředění	1. ředění	2. ředění
1. miska	0	0	0
2. miska	0	0	0

MRSA	2. ředění	3. ředění	4. ředění
1. miska	656 bakterií	63 bakterií	7 bakterií
2. miska	452 bakterií	84 bakterií	7 bakterií

Tabulka počtu kolonií v moštu – 28. den kvašení

Vetlinské zelené

GKCH	2. ředění	3. ředění	4. ředění
1. miska	49 kvasinek	9 kvasinek	1 kvasinka
2. miska	60 kvasinek	20 kvasinek	0

MRSA	4. ředění	5. ředění	6. ředění
1. miska	9 bakterií	1 bakterie	0
2. miska	20 bakterií	0	0

Tabulka počtu kolonií v mladém víně – 1. 11. 2015

Frankovka

GKCH	0. ředění	1. ředění	2. ředění
1. miska	0	0	0
2. miska	0	0	0

MRSA	0. ředění	1. ředění	2. ředění
1. miska	80 bakterií	15 bakterií	0
2. miska	92 bakterií	23 bakterií	0

Tabulka počtu kolonií v moštu – 39. den kvašení

Vetlinské zelené

GKCH	0. ředění	1. ředění	2. ředění
1. miska	954 kvasinek	62 kvasinek	20 kvasinek
2. miska	1462 kvasinek	83 kvasinek	26 kvasinek

MRSA	3. ředění	4. ředění	5. ředění
1. miska	324 bakterií	45 bakterií	4 bakterie
2. miska	300 bakterií	43 bakterií	3 bakterie

Tabulka počtu kolonií v mladém víně – 12. 11. 2015

Frankovka

GTK	0. ředění	1. ředění	2. ředění
1. miska	0	0	0
2. miska	0	0	0

GKCH	0. ředění	1. ředění	2. ředění
1. miska	0	0	0
2. miska	0	0	0

MRSA	0. ředění	1. ředění	2. ředění
1. miska	15 bakterií	3 bakterie	18 bakterií
2. miska	14 bakterií	2 bakterie	21 bakterií

ACA	0. ředění	1. ředění	2. ředění
1. miska	0	0	0
2. miska	0	0	0

Tabulka počtu kolonií v moštu – 43. den kvašení

Vetlinské zelené

GKCH	0. ředění	1. ředění	2. ředění
1. miska	50 kvasinek	11 kvasinek	0
2. miska	34 kvasinek	5 kvasinek	0

MRSA	3. ředění	4. ředění	5. ředění
1. miska	328 bakterií	38 bakterií	6 bakterií
2. miska	412 bakterií	42 bakterií	5 bakterií

Tabulka počtu kolonií v mladém víně – 16. 11. 2015

Frankovka

živná půda	0. ředění		1. ředění		2. ředění	
	1. miska	2. miska	1. miska	2. miska	1. miska	2. miska
GTK	0	0	0	0	0	0
GKCH	0	0	0	0	0	0
MRSA	0	0	0	0	0	0
ACA	0	0	0	0	0	0

Tabulka počtu kolonií v mladém víně 23. 11. 2015*Vetlinské zelené*

živná půda	0. ředění		1. ředění		2. ředění	
	1. miska	2. miska	1. miska	2. miska	1. miska	2. miska
GTK	0	0	0	0	0	0
GKCH	0	0	0	0	0	0
MRSA	80 bakterií	92 bakterií	15 bakterií	23 bakterií	0	0
ACA	0	0	0	0	0	0

Tabulka počtu kolonií ve víně 23. 11. 2015 po 2. stáčení*Frankovka*

živná půda	0. ředění		1. ředění		2. ředění	
	1. miska	2. miska	1. miska	2. miska	1. miska	2. miska
GTK	0	0	0	0	0	0
GKCH	0	0	0	0	0	0
MRSA	0	0	0	0	0	0
ACA	0	0	0	0	0	0

Tabulka počtu kolonií v mladém víně 6. 12. 2015*Vetlínské zelené*

živná půda	0. ředění		1. ředění		2. ředění	
	1. miska	2. miska	1. miska	2. miska	1. miska	2. miska
GTK	0	0	0	0	0	0
GKCH	0	0	0	0	0	0
MRSA	0	0	0	0	0	0
ACA	0	0	0	0	0	0

Tabulka počtu kolonií ve víně 6. 12. 2015 po 2. stáčení*Frankovka*

živná půda	0. ředění		1. ředění		2. ředění	
	1. miska	2. miska	1. miska	2. miska	1. miska	2. miska
GTK	0	0	0	0	0	0
GKCH	0	0	0	0	0	0
MRSA	0	0	0	0	0	0
ACA	0	0	0	0	0	0

Tabulka počtu kolonií ve víně 11. 1. 2016 po 2. stáčení*Veltlínské zelené*

živná půda	0. ředění		1. ředění		2. ředění	
	1. miska	2. miska	1. miska	2. miska	1. miska	2. miska
GTK	0	0	0	0	0	0
GKCH	0	0	0	0	0	0
MRSA	0	0	0	0	0	0
ACA	0	0	0	0	0	0

Frankovka

živná půda	0. ředění		1. ředění		2. ředění	
	1. miska	2. miska	1. miska	2. miska	1. miska	2. miska
GTK	0	0	0	0	0	0
GKCH	0	0	0	0	0	0
MRSA	0	0	0	0	0	0
ACA	0	0	0	0	0	0