

Výskyt bakterií mléčného kvašení ve víně

Simona Lišková

Bakalářská práce
2010

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie a mikrobiologie potravin
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Simona LIŠKOVÁ**
Osobní číslo: **T06221**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Výskyt bakterií mléčného kvašení ve víně**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

- 1. Charakteristika bakterií mléčného kvašení se zaměřením na rod *Oenococcus***
- 2. Výskyt bakterií mléčného kvašení ve víně z pozitivního i negativního hlediska**
- 3. Ostatní mikroorganismy jako součást mikrobioty vína**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1]GORNER, Fridrich, VALÍK, Lubomír. Aplikovaná mikrobiológia požívatin. 1. vydanie. Bratislava : Malé centrum, 2004.

[2]KLABAN, Vladimír. Ilustrovaný mikrobiologický slovník. 1. vyd. Houdek Lubomír, Dernerová Soňa. Praha : Galén, 2005. ISBN 80-7262-341-9.

[3]PÁTEK, Jaroslav . Nová vinařská abeceda . Brno : Blok, 1995.

[4]JACKSON, Ron S. Wine science : principles,practise,perceprion. 2nd rev. edition. [s.l.] : Academic Press, 2000. 648 s. ISBN 978-0-12-379062-0.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce:

11. února 2010

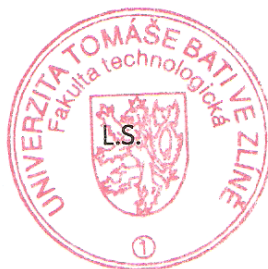
Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2010

Ve Zlíně dne 15. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Jan Hrabě, Ph.D.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá výskytem mikroorganismů ve víně a jejich vlivem na výslednou kvalitu produktu. Práce obsahuje také základní poznatky z hlediska výroby a složení vína. Důraz je však kladen na výskyt mikroorganismů ve víně (bakterie mléčného kvašení, bakterie octového kvašení, kvasinky a plísně), které se jednak uplatňují v technologii výroby vín, ale které mohou mít negativní vliv na výsledný produkt. Největší část byla věnována bakteriím mléčného kvašení, které právě mohou mít pozitivní i negativní vliv při výrobě vína.

Klíčová slova: mikroorganismy, víno, bakterie mléčného kvašení, bakterie octového kvašení, kvasinky, plísně

ABSTRACT

This work deals with appearance of microorganisms in wine and their influence on resulting product quality. The thesis also contains basic knowledge about production and composition of wine, however, the accent is especially put on microorganisms attended in wine (lactic acid bacteria, acetic bacteria, yeasts and fungi) which can be applied in wine producing technologies and which can also have negative influence on final product. Therefore, the biggest part is focused on lactic acid bacteria which can just have both positive and negative influence on wine production.

Keywords: microorganisms, wine, lactic acid bacteria, acetic acid bacteria, yeasts, fungi

Poděkování:

Ráda bych poděkovala touto cestou RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D., která vedla moji bakalářskou práci a pomáhala mi svými odbornými znalostmi a radami při zpracovávání této práce.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské/diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem citoval(a). V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uveden(a) jako spoluautor(ka).

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

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 21.5.2010


.....

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 vzdělávacího 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 přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 VÍNO	12
1.1 VÝROBA VÍNA	12
1.2 SLOŽENÍ VÍNA.....	14
1.2.1 Etanol	15
1.2.2 Zbytkový cukr	15
1.2.3 Glycerol.....	16
1.2.4 Kyseliny.....	16
1.2.5 Barevné látky v bobulích a víně	17
1.2.6 Třísloviny	17
1.2.7 Extrakt.....	18
1.2.8 Popel.....	18
2 MIKROBIOLOGIE MOŠTŮ A VÍNA	19
3 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	21
3.1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ VE VÍNĚ.....	22
3.1.1 Význam bakterií mléčného kvašení ve víně.....	23
3.1.1.1 Biologické odbourávání kyselin.....	24
3.1.1.2 Jablečno-mléčné kvašení	24
3.1.1.3 Hlavní reakce jablečno-mléčného kvašení.....	26
3.1.1.4 Vliv jablečno-mléčného kvašení na organoleptické vlastnosti vína ...	28
3.1.2 Negativní význam bakterií mléčného kvašení ve víně.....	29
3.1.2.1 Zvýšení kyselosti vína.....	29
3.1.2.2 Mléčné a manitové kvašení.....	29
3.1.2.3 Zvrhnutí vína.....	30
3.1.2.4 Myšina.....	30
3.1.2.5 Tvorba biogenních aminů	31
3.2 ROD <i>LEUCONOSTOC</i>	32
3.3 ROD <i>OENOCOCCUS</i>	33
3.3.1.1 Genotypová analýza a vývoj <i>O. oeni</i>	34
3.4 ROD <i>WEISSELLA</i>	34
3.5 ROD <i>LACTOBACILLUS</i>	35
3.6 ROD <i>PEDIOCOCCUS</i>	36
4 BAKTERIE OCTOVÉHO KVAŠENÍ	38
4.1 OCTOVÉ KVAŠENÍ.....	39
4.2 TĚKAVÉ KYSELINY	40
5 KVASINKY	41

5.1	ALKOHOLOVÉ KVAŠENÍ	41
5.2	VADY VÍN ZPŮSOBENÉ KVASINKAMI.....	43
6	PLÍSNĚ.....	44
	ZÁVĚR	45
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	46
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	50
	SEZNAM OBRÁZKŮ	51
	SEZNAM TABULEK.....	52

ÚVOD

Víno je alkoholický nápoj, vzniklý kvašením moštu, získaného z bobulí hroznů révy vinné. Výroba vína je staletí stará. Obliba i spotřeba vína na celém světě stoupají. Jedná se o fermentační proces, ve kterém dochází k mnohým mikrobiologickým přeměnám, které jsou uskutečňovány kvasinkami, bakteriemi a plísněmi. Tyto mikroorganismy se během technologického procesu výroby vína vzájemně ovlivňují. Mikroflóra vína se během celého, poměrně dlouhého procesu výroby, obměňuje.

Přeměna moštu na víno nastává skrz alkoholové kvašení, proces vykonávaný kvasinkami. Na tuto počáteční transformaci navazuje jablečno-mléčné kvašení, které vyvolávají bakterie mléčného kvašení. Oba procesy mají významný vliv na finální podobu vína.

Původ mikroorganismů a cesty, kterými se do vína dostávají, jejich přínos, nebo problémy s nimi spjaté jsou náplní předložené práce.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VÍNO

Vinařství je potravinářské výrobní odvětví zabývající se zpracováním vinné révy (*Vitis vinifera*) na hroznová vína a vedlejší výrobky. [1] Víno je jedním z nejdéle známých alkoholických nápojů, které se vyrábí zkvašováním hroznů za pomoci kvasinek. [2] V potravinách je víno zařazeno mezi pochutiny, ale obsahuje i látky nezbytné pro výživu člověka, jako sacharidy, bílkoviny, mastné kyseliny, vitaminy a minerální látky. Jeho obliba i spotřeba na celém světě stále stoupají. Nejvýznamnějšími vinařskými zeměmi jsou Itálie, Francie, Španělsko, Portugalsko a Argentina. Odrůdy révy vinné jsou plodiny s vysokými nároky na půdu, živiny a sluneční svit. [2] Za předpokladu vhodné teploty kvasinky rostou na cukerném substrátu a mění jej na alkohol a oxid uhličitý. Žádoucí je populace kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které dominují nad ostatními populacemi kvasinek, když obsah alkoholu přesahuje 5%. [3]

Kvašení je nevyhnutelný proces při výrobě vína. [3] Je to proces, během kterého enzymy mikroorganismů přeměňují zdroje energie na jeden, nebo více chemických produktů. [4] Existuje mnoho cest kvašení, nejběžnějším je alkoholové kvašení, jehož původcem je právě *S. cerevisiae*. V něm dochází ke změně substrátu (glukosy), na produkt (etanol). [5]

Nejlépe se révě vinné daří v oblastech, kde nejsou silné zimní mrazy, a kde je v létě dostatek slunečných dnů. V našich klimatických podmínkách hrozny dozrávají koncem září a začátkem října, kdy se sklízají. Období sklizně hroznů se nazývá vinobraní. Hrozny se sklízají v plné zralosti, neboť předčasně sklizené hrozny vytváří vína kyselá s drsnou a neharmonickou chutí. [2]

Základní dělení vín je na vína tichá a šumivá. Základním rozdílem mezi nimi je, že šumivá vína jsou syčená oxidem uhličitým. Dále se obecně klasifikují podle barvy (červená, bílá, růžová) a obsahu alkoholu. Stolní vína mají obvykle obsah etanolu 7% – 14%. Jsou i vína obohacená o alkohol jako např. portské, v kterých obsah alkoholu přesahuje 14%. Podle obsahu zbytkového cukru vína dělíme na suchá, polosuchá, polosladká a sladká. [6]

1.1 Výroba vína

Výroba vína je staletí stará biotechnologie a stala se celosvětovým podnikáním, které významně ovlivňuje ekonomiku mnoha zemí. Výroba vína se týká v podstatě zisku hroznové šťávy (moštu) drcením ovoce a alkoholovým kvašením pomocí kvasinek (endogenních,

nebo exogenních kultur), zrání, čiření a balení. [6] Přírodní bílá vína se vyrábějí ze žlutých, růžových a červených odrůd, přírodní červená vína z modrých odrůd. Většina kroků výroby je u bílých i červených vín obdobná. [2] Výroba vína se soustřeďuje do lisovny, kvasírny a do sklepa. Hrozny na mošt se zpracovávají v lisovně. V kvasírně se nakvašují drcené hrozny (rmut) pro výrobu červených vín, odkalují se a kvasí mošty. Ve sklepě se odehrává závěrečná fáze vinařovy práce. Tam se víno školí, vyžrává a odpočívá před stáčením do lahví. [7]

Sklizené hrozny se dopravují do zpracovatelských závodů. Zjišťuje se jejich hmotnost a stanovuje se jejich průměrná cukernatost. K zjišťování cukernatosti se používají různé druhy moštoměrů, (přístrojů na měření obsahu cukru v hroznech a mošttech). U nás je uzákoněn Český normalizovaný moštoměr (°NM), který udává kolik kg cukru je ve 100 litrech moštu. Užívá se i Klosterneubursky moštoměr (°KMW), ten udává kolik kg cukru je ve 100 kg moštu. [2]

V lisovně se hrozny na odzrňovačích zbaví třapin. Rmut se dopravuje do scezovacích nádob. Po scezení se rmut důkladně vylisuje, aby se získalo co nejvíce moštu. [7] K zisku kvalitního moštu, zaručujícího hladký průběh kvašení a vysokou jakost vyrobeného vína, je třeba mošt získaný lisováním dodatečně upravovat. Úpravy se provádí odkalováním, provzdušňováním, sířením, odkyselováním, okyselováním a úpravou cukernatosti. [2]

Získaná hroznová šťáva (mošt) se dá do kvasných nádob, kde bouřlivě kvasí. [7] Ve vinařství se používají kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, stále více se používají i ve formě ASVK – aktivovaných sušených vinařských kvasinek. Dříve se především využívalo spontánní kvašení způsobené kvasinkami ulpělými na povrchu hroznů. Dnes se používá i řízené kvašení, kdy se zákvas připravuje v množstvích 1% veškerého moštu namnožením vhodné odrůdy vinných kvasinek v malém podílu sterilního moštu. [1] Během kvašení kvasinky vytváří při zvýšené teplotě alkohol a oxid uhličitý. [7] Kvašení, které probíhá ve vertikálních či horizontálních tancích, má tři fáze: začátek kvašení, bouřlivé kvašení a dokvašení. [1]

Začátek kvašení charakterizuje pozvolné rozmnožování kvasinek a pomalý začátek prokvašování cukrů moštu, trvá 2 -3 dny. Bouřlivé kvašení se projevuje vývinem tepla, zvýšením teploty nad 25 °C, uvolňováním oxidu uhličitého a nastává třetí až čtvrtý den. V této fázi kvašení, která trvá několik dnů, až týdnů, se musí regulovat teplota v rozmezí 15 – 18 °C.

Dokvašování je poslední fází. Nastává po poklesu obsahu cukru na 2 – 5 g/l a trvá 1-2 měsíce, někdy i půl roku. Činnost kvasinek se postupně omezuje, až ustane. Poté začnou kvasinky sedimentovat na dno tanku, usazují se také kaly. [1]

Po prokvašení moštu vzniká mladé víno, to se musí zbavit nečistot, např. zbytků slupek, dužiny, mrtvých kvasinek aj. Tyto nečistoty usazené na dně nádob tvoří tzv. kvasnou sedlinu. Mladé víno se nechá v klidu, aby se samo vyčistilo. Potom se kvasnicový kal odstraňuje stáčením mladého vína. Je třeba den před stáčením vína sklep důkladně vyčistit a dezinfikovat sírou. Také sudy, pomocné nádoby, hadice a čerpadla je nutné prohlédnout a vyčistit, protože během stáčení vzniká nebezpečí kontaminace nežádoucími mikroorganismy. Čím více péče a čistoty se věnuje hygieně prostředí, tím lepší je kvalita vína. [7] Při prvním stáčení do čistých zasířených kvasných tanků se víno obvykle provzdušní a nastane vysrážení kalů, především tříslobílkovinných. Proto se víno po 6 až 8 týdnech znovu stáčí. [2]

1.2 Složení vína

Víno je přírodní nápoj. Výroba vína z hroznů je přirozený biologický proces, který uchovává a transformuje látky, které réva načerpala z vody, půdy a vzduchu za pomoci slunce. Z chemického hlediska by se mohlo zdát, že víno je jednoduchý roztok vody a alkoholu, jelikož vody je ve víně kolem 85 % a alkoholu mezi 7 až 15 %. Je v něm ale i řada dalších látek jako jsou cukry, kyseliny, minerální látky, fenolické látky, aromatické látky a dusíkaté látky. Kvašením moštu z vyzrálých bobulí révy vinné vzniká hroznové víno, které je velmi komplexní. Obsahuje mnoho různých přírodních chemických látek. [8]

Hrozny révy vinné se skládají z třapin se stopkami tvořících hlavní nosnou kostru hroznu a z bobulí různé velikosti, barvy a tvaru. Bobule se skládá z dužiny, semen a slupek. Při výrobě většiny vín se třapiny se slupkami musí odstranit, neboť obsahují chuťově nepříznivé třísloviny (polyfenoly) a dřevité látky. Dužina většiny odrůd je bezbarvá, výjimečně je narůžovělá a obsahuje sladkou šťávu. Skládá se z vnější šťavnatější a vnitřní tužší vrstvy. Uvnitř bobulí jsou ve formě peciček uložena semena s vysokým obsahem lipidů a tříslovin. Během výroby červených vín se polyfenoly semen vyluhují do moštu. [2] Nejdůležitějšími složkami vína, které podstatně ovlivňují jeho jakost jsou: etanol, zbytkový cukr, glycerol, kyseliny ve víně, barevné látky v bobulích a ve víně, třísloviny, extrakt, popel. [9]

1.2.1 Etanol

Vína s obsahem alkoholu pod 10 obj. % jsou z nevyzrálých hroznů, z klimaticky nepříznivého ročníku, ze špatných poloh a jsou tudíž slabá, nevýrazná a snáze podléhají kontaminaci než vína s normálním obsahem alkoholu. Jen výjimečně se u nás dostávají do prodeje. Prostředně silná vína mají 10,5-12 obj. % alkoholu.

Silná až ohnivá vína jsou s 12-14 obj. % alkoholu. Nad 14 obj. % alkoholu jsou vína velmi silná, těžká, opojná. Vína s obsahem 16-18 obj. % alkoholu patří do kategorie speciálních vín, bylo jim totiž přidáno určité množství vinného destilátu. [9]

1.2.2 Zbytkový cukr

Ve víně po vykvašení zůstává ještě určité množství neprokvašeného, tzv. zbytkového cukru. Nachází se u moštu s vyšším obsahem cukru. [9]

Tab. 1. Rozdělení tichých vín podle obsahu zbytkového cukru. [10]

Typ	Charakteristika
suchá	Víno prokvašené na nízký obsah zbytkového cukru, který smí obsahovat max. 4g/zbytkového cukru na litr, nebo maximálně 9g cukru v litru, pokud rozdíl zbytkového cukru a celkového obsahu kyselin přepočtený na kyselinu vinnou je 2 gramy nebo méně.
polosuchá	Ve víně je obsah zbytkového cukru větší než nejvyšší hodnota stanovená pro vína suchá, ale nepřesahuje 12g v litru vína.
polosladká	Zbytkového cukru je více než nejvyšší hodnota pro vína polosuchá, není ale vyšší než 45g na 1 litr.
sladká	Jak sensoricky tak analyticky je vyšší obsah zbytkového neprokvašeného cukru. Jedná se o vína speciální, určená pro dlouhá zrání. Obsah alkoholu u tichých sladkých vín je nižší kolem 7-11 obj. % a obsah zbytkového cukru je ve výši nejméně 45g na litr.

Jednotlivé druhy vína se rozdělují do několika skupin. [10] Obecně jsou vína rozříděna podle barvy (červené, bílé, růžové) a obsahu alkoholu. [4] V České republice se vína rozdělují podle odrůdy a vyzrállosti hroznů stanovovanou měřením obsahu cukru v hroznové šťávě v době sklizně. Podle obsahu zbytkového cukru, tedy chuti, se dělí na vína suchá, polosuchá, polosladká a sladká. [4, 10] Podle poslední změny vinařského zákona vyvstala možnost označovat víno podle původu hroznů. [10]

Do skupiny tichých vín se řadí stolní víno, zemské víno, jakostní víno, jakostní víno s přílastkem. Rozdělení tichých a šumivých vín podle obsahu zbytkového cukru ukazují Tab. 1 a 2. [10]

Tab. 2. Rozdělení šumivých vín podle obsahu zbytkového cukru. [10]

Typ	Charakteristika
Brut nature	Obsah cukru nižší než 3 g na 1 litr (pouze pro produkty, kterým po druhotném kvašení nebyl dodán žádný cukr.
Extra brut	Obsah cukru je mezi 0 - 6 g na 1 litr
Brut	Obsah cukru je nižší než 15g na 1 litr
Extra dry	Obsah cukru je mezi 12 - 20 g na 1 litr
Sec	Obsah cukru je mezi 17 - 35 g na 1 litr
Demi-sec	Obsah cukru je mezi 33 - 50 g na 1 litr
Doux	Obsah cukru je vyšší než 50 g na 1 litr

1.2.3 Glycerol

Glycerol dává vínu sladkou chuť, spolu s vysokomolekulárními alkoholy a některými aminokyselinami. Jeho obsah ve víně se pohybuje mezi 4 - 10 g/l. Pomáhá jakosti vína, dává mu plnost a hladkost. [9]

1.2.4 Kyseliny

Obsah kyselin ve víně je v průměru 5 - 6 g/l a skládá se z organických kyselin, jako jsou kyselina vinná, která převládá, kyselina jablečná, mléčná a v malých množstvích kyselina jantarová, citronová, glykolová a glyoxylová. [9] Obsah všech kyselin v moště závisí především na koncentraci kyseliny vinné a kyseliny jablečné. [11] Důležitější pro chuť vína, než jejich obsah, je spíše jejich působení ve vínu. Stupeň kyselosti závisí na druhu kyseliny a také na tom, jak moc jiné látky obsažené ve vínu dají kyselinám vyniknout či nikoliv.

Teplota maskuje kyselost červených vín, při vyšší teplotě se zdají méně kyselá, než při teplotě nižší. Vína chudá na kyseliny bývají fádňí, a pokud mají i nízký obsah alkoholu a extraktu jsou podřadná a nezajímavá. V chemické analýze se obsah kyselin v moštu a víně uvádí v různých hodnotách – ve volných kyselinách, veškerých kyselinách, nebo titrovatelných kyselinách. [9]

Veškerými titrovatelnými kyselinami ve víně rozumíme množství volných kyselin těkavých (mimo kyseliny uhličitě), netěkavých a kyselých solí, které je možné stanovit titrací hydroxidem sodným či draselným. [11] Kyselina uhličitá v mladých vínech působí příjemně. Nesmí být uměle přidána, musí pocházet z vína a vzniknout kvašením. [9] Těkavé kyseliny jsou tvořeny přítomnými mastnými kyselinami, které se ve víně vyskytují volně nebo ve formě solí. [11] Množství těkavých kyselin, převážně kyseliny octové – v koncentraci od 0,2 do 0,6 g/l nijak neovlivňuje chuť vína. Horším dojmem působí vína mající obsah těkavých kyselin vyšší. Při nečistém kvašení může ve víně vzniknout i kyselina máselná, která dává vínu nepříjemnou žluklou chuť. [9]

1.2.5 Barevné látky v bobulích a víně

V hroznech bílých odrůd majících barvu mezi zelenou a zlatě žlutou, je směs zelených (chlorofylu) a žlutých (xantofylu a karotenu) rostlinných barviv. Červené víno vděčí za svou barvu oeninu, který patří do skupiny antokyanů. Je uloženo ve slupkách modrých bobulí a uvolňuje se díky vznikajícímu alkoholu při nakvašení rmutu, který způsobí popraskání buněk s barvivem. Podíl na vyluhování barviva ze slupek mají i kyseliny obsažené ve rmutu, zejména kyselina vinná a jablečná, nemají však vliv na intenzitu zbarvení. [9]

1.2.6 Třísloviny

Třísloviny jsou obsaženy v zrnkách, slupkách a třapínách hroznů. Do vína se dostávají v menším či větším množství, záleží na způsobu zpracování hroznů. Ve větším množství dávají vínu trpkou, drsnou chuť. Trpkost je přirozená chuťová vlastnost červených vín, nesmí jí však být přemíra. Bílá a růžová vína jsou méně bohatá na tanin, protože je v nich vysoký obsah nevítaný. Jeho obsah se snižuje odzrňováním dostatečně nevyzrálých hroznů před lisováním. Trpkost vín pochází někdy i ze dřeva nových dubových sudů, které nebyly dostatečně vymyty. [9]

1.2.7 Extrakt

Extrakt je souhrn látek, které dávají vínu plnost. Zůstává ve vínu po oddestilování alkoholu a ostatních těkavých složek. Jedná se především o cukry, netěkavé kyseliny, třísloviny, barviva a popel. Extraktový zbytek slouží k zjišťování pravosti vína. Získáme ho odečtením cukrů a netěkavých kyselin z celkového extraktu. [9]

1.2.8 Popel

Popel je definován jako souhrn látek zbylých po spálení (oxidaci organického materiálu) vína při teplotě 500 – 550 °C. Spálením se všechny přítomné kationty vína (mimo amonného) převedou do podoby uhličitánů, nebo jiných bezvodých anorganických solí. [11] Jsou to především kationty draslíku, sodíku, vápníku, hořčíku a také velmi malé množství železa, hliníku a mědi a anionty kyseliny sírové, fosforečné, křemičité a uhličitě. [9]

2 MIKROBIOLOGIE MOŠTŮ A VÍNA

V hroznech se základní mikroflóra skládá zejména z kvasinek (*Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces* spp.), z bakterií mléčného kvašení a bakterií octového kvašení (*Gluconobacter*, *Acetobacter* spp.) a z plísní (*Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Ucinula*, *Cladosporium* spp.). [4]

Zdrojem mikroorganismů jsou hrozny a vinařské zařízení. Hrozny z vinic jsou osídleny populací mikrobů, z nichž dochází k množení některých kvasinek, bakterií a plísní. [12] Nejvíce mikroorganismů z hroznů se do moštů dostane z půdy. V půdě se nachází nejvíce kvasinek v době, kdy hrozny zaměkají a při jejich sklizni. V průběhu vinobraní však mohou být z velké části smyty deštěm. Kromě kvasinek se z půdy na hrozny, a tudíž i do moštů, dostává mnoho plísní i nežádoucích bakterií. [13] Vinařské vybavení (odzrňovačka, potrubí, sudy atd.) také obsahují mikroorganismy. Pokud je tedy mošt v kontaktu s různým vinařským vybavením a kvasinky, bakterie a plísně mají kontakt s tímto povrchem, tak do něj přechází. Pokud podmínky prostředí dovolí, dochází k množení a začne kvašení. [12]

Výroba vína je proces, ve kterém je série kompletních mikrobiologických přeměn, uskutečňovaných kvasinkami, bakteriemi a plísněmi a jejich interakcemi. [12]

Na životní prostředí různých mikroorganismů ve víně mají důležitý vliv teplota, množství alkoholu, oxidačně-redukční prostředí, ale také stupeň kyselosti vína. Stupně těchto hodnot pro existenci různých mikroorganismů jsou různé. Sklepní technici je musejí znát, aby se mohli přizpůsobit v různých situacích, do kterých se víno ve svém vývoji dostává. [9] Organoleptické vlastnosti vína závisí na odrůdě a metabolické aktivitě kvasinek a bakterií. Na výrobě vína se podílí mnoho mikroorganismů, které se popisují jako endogenní (z hroznů, nebo z vinařských ploch) a exogenní (z vybraných startovacích kultur). Kvasinky i bakterie mohou na jakost vína působit jak prospěšně, tak škodlivě. [6]

Přírodní typy kvašení vína využívají volně žijící mikroflóru na povrchu hroznů, převážně spolu s kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*. Kůže zdravých hroznů má obvykle mikrobiální populaci $10^3 - 10^5$ CFU/g. [6] Na výrobě vína se podílí jen kvasinky a bakterie mléčného kvašení. Plísně a bakterie octového kvašení jsou z moštu vypuzeny, jakmile jsou hrozny přelity do fermentační nádrže, protože v médiu nastává nízký redoxní potenciál. Kvasinky jsou lépe přizpůsobeny pro růst v hroznovém moštu, nevadí jim vysoká koncentrace cukru ani nízké pH 3,0 – 3,3. Proto alkoholové kvašení začíná jako první. [14] Tuto

3 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Bakterie mléčného kvašení (BMK) představují skupinu grampozitivních bakterií spojených morfologickými, metabolickými a fyziologickými vlastnostmi. [16] Zahrnují skupiny bakterií kokovitého i tyčinkovitého tvaru. Z potravinářsko-mikrobiologického hlediska má tato skupina velký technologický význam. Vyskytují se v mléku a ve fermentovaných mléčných produktech, ale také na rozkládajících se rostlinách, ve střevech a na sliznicích lidí a zvířat. [17]

BMK produkují kyselinu mléčnou jako významný konečný produkt během kvašení ze sacharidů. To, jaké jsou hranice skupiny, je předmětem diskuze, ale z historického hlediska rody *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Streptococcus* tvoří hlavní zástupce skupiny BMK. Neustálé taxonomické opravování těchto druhů a popisování nových znamená, že BMK mohou v jejich širokém fyziologickém vymezení zahrnovat kolem 20 rodů. Nicméně z praktického hlediska v potravinářské technologii se za hlavní považují tyto: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella*. [16] Další rody jsou *Abiotrophia*, *Agitococcus*, *Alcalibacterium*, *Allofustis*, *Alloicoccus*, *Atopobacter*, *Atopococcus*, *Atopostipes*, *Desemzia*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Globicatella*, *Granulicatella*, *Ignavigranum*, *Isobaculum*, *Lactosphaera*, *Lactovum*, *Marinilactibacillus*, *Melissococcus*, *Paralactobacillus*. [16, 42] Rod *Bifidobacterium* je často považován za související s BMK a sdílí některé jejich typické rysy, je však fylogeneticky nepřibuzný a má jedinečný styl cukerného kvašení. Klasifikace BMK u rozdílných rodů je zejména založeno na morfologii, způsobu cukerného kvašení, růstu v rozdílné teplotě, různé produkci kyseliny mléčné, schopnosti růst ve vysokých koncentracích solí a kyselé nebo alkalické toleranci. [16]

Historická tradice BMK sahá před 20. století. První získaná bakterie byla *Bacterium lactis* (pravděpodobně *Lactococcus lactis*) a získal ji v roce 1873 Joseph Lister. Zmatek v klasifikaci BMK nastal, když se objevila monografie S. Orla Jensena. Tato práce dánského mikrobiologa měla velký dopad na systematiku BMK. Opravil značný rozsah v klasifikaci BMK, avšak podstata systematiky zůstala pozoruhodně zachována. Orla Jensen používal následující charakteristiky jako základ pro třídění: morfologii (koky, nebo tyčinky), mechanismus glukosového kvašení (homo- nebo heterofermentativní kvašení), růst v určité

teplotě. Tyto charakteristiky jsou stále velmi důležité v klasifikaci BMK. [16] Bakterie mléčného kvašení rozdělil na dvě skupiny: homofermentativní a heterofermentativní.

Homofermentativní mléčné bakterie zkvašují laktosu, glukosu i další monosacharidy a přeměňují je na kyselinu mléčnou. Při heterofermentativním mléčném kvašení se tvoří směs kyseliny mléčné, etanolu a CO₂, v menším množství i některé další kyseliny, zejména kyselina mravenčí a kyselina octová. [18]

BMK ve svém fermentativním metabolismu vytváří podmínky a produkují látky, které jsou pro jiné, většinou nežádoucí bakterie škodlivé. Konzervační vlastnosti BMK a jejich fermentační produkty se využívají na prodloužení trvanlivosti potravin živočišného a rostlinného původu. Dalším jejich selekčním faktorem je rychlé snížení pH prostředí na hodnoty kolem pH 4. Mnohé nežádoucí bakterie v potravinách nesnášejí takto nízké hodnoty pH. Pro většinu BMK není vzdušný kyslík toxický, rostou i za přítomnosti vzduchu. Mohou být aerotolerantní, mikroerofilní, nebo fakultativně anaerobní. Výjimku tvoří přísně anaerobní bifidobakterie. BMK vyžadují v prostředí mnoho živin a růstových faktorů, které jim v přírodě poskytují intaktní a rozkládající se rostliny a potraviny. Na bohatý zdroj živin si natolik přivykli, že neumí samy syntetizovat některé aminokyseliny, vitaminy skupiny B a jiné. [18]

BMK jsou důležitou složkou společenstev technologicky významných mikroorganismů, které se používají jako výrobní prostředky při fermentačních procesech v technologii kysaných a kvašených potravin. [17]

3.1 Bakterie mléčného kvašení ve víně

Na bobulích hroznů je bakteriální populace nízká, nebo jen málo z nich je schopno růst na nutričním médiu MRS v laboratorních podmínkách. Mnohem více bakterií může být izolováno z drcených hroznů přelitých do kvasných nádob. Jejich populace se pohybuje mezi 10² až 10⁴ CFU/ml v závislosti na klimatických podmínkách během posledních dnů zrání hroznů. Počet je ve vzájemném vztahu především s pH (čím vyšší je pH, tím vyšší je konečná populace BMK). V této fázi lze identifikovat 8 nebo 9 druhů. [14] BMK izolované z hroznového moštu patří k dvěma čeledím reprezentovanými čtyřmi rody, čeled' *Lactobacillaceae* a *Streptococcaceae*, a rody: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*. [19, 20] Během prvních dnů alkoholového kvašení se počet BMK obecně zvyšuje na maximum 10⁴ CFU/ml poté se snižuje k 10² CFU/ml na konci alkoholového kvašení.

Obsah etanolu pro BMK může být maximálně 5 – 6 %. [14] Významné není jen konečné snížení počtu bakterií, ale také původní rozmanitost druhů. [20] Ve většině případů *Oenococcus oeni* převažuje na konci a po alkoholovém kvašení. Identifikací pomocí hybridizace kolonií s použitím celkové genomové DNA jednoznačně vyplývá, že druhy *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc mesenteroides* postupně mizí nebo jsou přinejmenším v příliš nízkých koncentracích, aby byly zjištěny. Nicméně některé další druhy bakterií nejsou odstraněny. [14]

Jablečno-mléčné kvašení nastane, když počet BMK dosáhne 10^6 CFU/ml nejčastěji po ukončení alkoholového kvašení. Zahájení tohoto kvašení závisí na teplotě, pH, obsahu etanolu. Tyto hlavní faktory rovněž určují bakteriální růst ve víně. Vytvoření mastných kyselin a etanolu, který působí, na bakteriální membránu, jsou inhibitory růstu BMK. [14] Některé kmeny kvasinek mohou z metabolismu sloučenin síry produkovat relativně velké množství SO_2 . Kromě toho, že kvasinky zvyšují toxicitu média, může v průběhu bouřlivé fáze růstu kvasinek nastat i nedostatek zdrojů dusíku. Nicméně toto relativní vyhladovění je přechodné, protože kvasinky uvolňují aminokyseliny, zejména na konci alkoholového kvašení. Z různých druhů BMK, je druh *Oenococcus oeni* - pravděpodobně nejlépe přizpůsoben k překonání těchto překážek. Avšak některé kmeny *Pediococcus* a *Lactobacillus* mohou také přežít. Jsou původci kažení při výrobě vína, kdy byly také prokázány vzájemné interakce mezi jednotlivými BMK. [14]

3.1.1 Význam bakterií mléčného kvašení ve víně

Proces výroby vína zahrnuje dva základní kroky, alkoholové kvašení a jablečno-mléčné kvašení (JMK). Alkoholové kvašení pomocí kvasinek začíná dříve, kvasinky během něj fermentují sacharidy na etanol. Jejich počet se snižuje a postupně dojde k růstu BMK. Během svého růstu BMK zkvašují zbytkový cukr, hexosy a pentosy zbylé po kvasinkách a transformují četné vinné složky. Po alkoholovém kvašení následuje JMK. Až je všechna kyselina jablečná degradována, BMK jsou vyloučeny sířením. Oxid siřičitý je v této etapě výroby vína povolen a je efektivním činitelem pro mikrobiologickou stabilitu vína. I když je množství kyseliny jablečné důležité z hlediska vlivu na složení vína, jsou i další, více nebo méně známé substráty metabolizovány a pravděpodobně mají rozhodující vliv na jakost vína. [14]

Vliv BMK na víno závisí na druhu a dokonce i jejich kmenu a době, kdy se množí. [14] V mnoha případech při výrobě vína kontrolované znásobení a zvýšení biochemických reakcí podporovaných bakteriemi mléčného kvašení zlepšují kvalitu a stabilitu vína. Nicméně ho mohou také znehodnotit a někdy z něj učinit i neprodejné. BMK mohou víno poškozovat během výroby nebo během zrání, včetně lahvového zrání. [20] Proto je nutné kvasinky i bakterie kontrolovat během výroby vína. Během zrání a stárnutí musí být odstraněny, dle možností výrobce. Během těchto fází dochází totiž k hlavním chemickým reakcím, které mění barvu vína a chuť oxidací, esterifikací a polymerací z chemicky účinných složek. Vzhledem k rozmanitosti druhů a kmenů BMK v moště a víně, ovlivňujících složení vína, mohou různé faktory narušit harmonickou rovnováhu mikroflóry vína a vyvolat mírné či výrazné změny. Základní znalosti vzrostly když enologové identifikovali BMK ve víně, nicméně stále existuje mnoho rozporů, které se například týkají přírodní adaptace těchto bakterií k tak drsnému prostředí. Navíc jen u některých složek vína jsou známy jejich metabolické cesty, které se účastní dodávek energie a sensorické změny během zrání vína. [14, 21] Pro lepší porozumění těchto procesů budou popsány vlastnosti těchto bakterií a jejich efekt ve víně v následujícím textu.

3.1.1.1 Biologické odbourávání kyselin

Biologické odbourávání kyselin jako je jablečno-mléčné kvašení a ostatní biochemické přeměny kyselin jsou doprovázeny vylučováním vinného kamene ve formě vinanu vápenatého a hydrogenvinanu draselného a procesy samočištění vína, při nichž se srážejí a sedimentují shluky molekul opačného náboje organického i anorganického charakteru (bílkoviny, polyfenoly, barevné látky, slizy a kationty kovů i soli kyselin). Víno se samovolně čistí. Čistění lze urychlit čířením. Biologické odbourávání kyselin je proces, při němž se působením bakterií, zejména mléčného kvašení, mění kvalitativní i kvantitativní poměry nižších organických kyselin ve víně. Chuťově méně příznivé kyseliny jablečná, citronová a další se přeměňují na kyselinu mléčnou a ostatní produkty, které vínu poskytují jemnější chuť a zlepšují jeho stabilitu. Jsou to nezbytné procesy, zejména pro čistá bílá vína. [1]

3.1.1.2 Jablečno-mléčné kvašení

Jablečno-mléčné kvašení (JMK) nebo také malolaktické kvašení, spolu s alkoholovým kvašením jsou dva významné kroky pro výrobu téměř všech červených vín a mnoha bílých vín. Pojem JMK není správný, protože transformace kyseliny L-jablečné na kyselinu L-

mléčnou není fermentační cestou, jedná se o dekarboxylaci. Přesto vinaři tento pojem začali používat a to kvůli analogii s alkoholovým kvašením. Během obou kroků totiž z vína uniká CO₂, který probublává. V ideálních podmínkách JMK následuje během několika dnů po alkoholovém kvašení. [14] JMK může ve víně probíhat na základě metabolické aktivity mléčných bakterií, vyskytujících se spontánně na hroznech ve vinici nebo ve vinařském provozu. V důsledku jejich činnosti dochází k přeměně kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou a tím k celkovému snížení kyselosti vína. Změní se aromatické a chuťové projevy vína. [22] Mikroorganismy zodpovědné za toto kvašení jsou zastoupeny zejména několika druhy *Lactobacillus* spp. (*Lactobacillus casei*, *Lb. sake*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. fructivoran*), *Pediococcus* spp. (*Pediococcus parvulus*, *Ped. damnaus*, *Ped. pentosaceus*) a *Leuconostoc*. [4]

Činnost bakterií mléčného kvašení je při odbourávání kyseliny jablečné synergicky podpořena nejdříve rozvojem kvasinek a následně jejich odumíráním, kdy se autolýzou uvolňují z kvasinek aminokyseliny, vitamin B1 a další růstové látky podporující bakterie mléčného kvašení. [23]

Z hlediska odstranění kyseliny mléčné je však výhodnější inokulace čistou kulturou mléčných bakterií *Oenococcus oeni*. Je to nejdůležitější organismus, který zabezpečuje biologické odbourávání kyseliny jablečné. [22]

Výrobci vína použitím čisté bakteriální kultury mohou načasovat jablečno-mléčné kvašení a částečně ovlivnit i délku odbourávání kyseliny jablečné. Selektované bakterie mají také většinou pozitivní vliv na aromatický a chuťový projev vína. Správné načasování jablečno-mléčného kvašení je velmi důležité pro výrobu kvalitního vína. Doporučuje se nechat proběhnout po ukončení alkoholového kvašení. Aplikací mléčných bakterií do vína po ukončení alkoholového kvašení se vyhneme nadměrné produkci kyseliny octové a kyseliny D-mléčné, ty mohou negativně ovlivňovat aroma a chuť vína. Dalším způsobem aplikace mléčných bakterií je vzájemná inokulace čistých selektovaných kvasinek a mléčných bakterií. Dochází rovněž k přeměně kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou, při zachování ovocného charakteru vína. Přizpůsobit se zvyšujícímu obsahu alkoholu umožňuje mléčným bakteriím společná inokulace kvasinek a bakterií. Populaci bakterií negativně ovlivňuje přítomnost SO₂, který ji může potlačovat. Při optimálních podmínkách umožní společná inokulace rychlejší průběh jablečno-mléčného kvašení. Vína získávají méně „mléčného“

charakteru a zachovají si výraznější chuťovou a aromatickou svěžest, což je velmi významné u bílých vín. [22]

Úspěšné provedení JMK má pozitivní vliv na stabilitu vína a ovlivňuje ho několik faktorů. Hodnota pH je jedním z nejdůležitějších faktorů. K snadnějšímu rozmnožování mléčných bakterií a rychlejšímu průběhu jablečno-mléčného kvašení dochází tehdy, pokud je vyšší hodnota pH moštu nebo vína. Obvykle je pH mezi 3,0 - 3,6. V případě nízkého pH ho můžeme upravit odkyselením. Obsah oxidu siřičitého (SO₂) je rovněž významným faktorem ovlivňujícím nástup a průběh JMK. Oxid siřičitý velmi dobře eliminuje populaci všech bakterií. Významný je obsah především volného SO₂, který má vyšší antimikrobiální působení než vázaný SO₂. Teplota je dalším faktorem ovlivňujícím JMK. Optimální teplota pro bakterie zodpovědné za jablečno-mléčné kvašení leží mezi 22 - 25 °C. [22]

3.1.1.3 Hlavní reakce jablečno-mléčného kvašení

Hlavním přínosem JMK je biologické odkyselování, které je způsobeno transformací kyseliny L-jablečné (dikarboxylová kyselina) na kyselinu L-mléčnou (monokarboxylová kyselina). Dekarboxylace kyseliny jablečné na kyselinu L-mléčnou je katalyzována malolaktickým enzymem (MLE), který je velmi podobný jablečnému enzymu. Rozdíl je v tom, že jablečný enzym vytváří pyruvát, zatímco MLE tvoří L-laktát. MLE byl prvně zjištěn u *Lactobacillus plantarum*, dále byl tento enzym získán i z mnoha jiných BMK zastoupených ve víně. [14]

Kinetické parametry tohoto enzymu byly důkladně poprvé studovány u *Leuconostoc mesenteroides*. První sekvence sloučenin aminokyselin byly naměřeny v kmeni *Lactobacillus lactis*. Malolaktická aktivita je přísně závislá na integritě bakteriální membrány. Protože optimální pH enzymu je kolem 5,8; je potřeba kofaktorů (Mn₂C, NAD). Kvůli inhibičním účinkům mnoha komponentů vína (karboxylové kyseliny, polyfenoly), musí být protein chráněn od média buněčnou membránou. [14]

Sekvenci aminokyselin na N-terminálním konci malolaktického proteinu určil Daneyrolles et al. (1994). Za výchozí bod byl zvolen *mleS*, gen kódující malolaktický protein. *MleS* gen byl účinně transformován v *Saccharomyces cerevisiae*. Záměrem bylo přeměnit kmeny vinných kvasinek s *mleS* genem, tak aby k malolaktické přeměně mohlo dojít už během alkoholového kvašení. Nicméně kvasinky nemohly přeměnit všechnu kyselinu jablečnou kvůli omezením při přepravě substrátu uvnitř buňky. Klonování a exprese *mae1* genu kó-

dujícího malát v *Schizosaccharomyces pombe*-, spolu s *mleS* genem nakonec vedl - k rekombinaci *S. cerevisiae* tak, že kmen fermentoval jablečnou kyselinu z hroznového moštu během několika dnů. Integrace *mae1* a *mleS* genů do genomu vinných kvasinek je dalším krokem ke stabilizaci vína. [14]

Používání takových rekombinačních kmenů kvasinek by mohlo být technologickým řešením jablečno-mléčného kvašení. Nesmělo by být používáno pro všechny vína, protože JMK není jen transformace kyseliny jablečné, ale také řadou dalších biochemických reakcí a bakteriálního metabolismu. Vinaři a vinařští mikrobiologové na konci 70. let zjistili, jak vyřešit obtíže při spouštění JMK, a to myšlenkou naočkování vybranými malolaktickými spouštěči. Nedostatek populace - BMK, odpovědných za absenci JMK, může být potlačen přidáním vysokého počtu buněk. Bylo provedeno mnoho neúspěšných pokusů, až do doby, než objevili zlepšení přežití čerstvě inokulovaných bakterií do vína „reaktivačním“ krokem. Od té doby se začalo několik vybraných startérů prodávat. Lyofilizované nebo zmrazené přípravky jsou inkubovány ve vhodném médiu složeného zejména z hroznového moštu nebo vína a kvasničného extraktu po dobu jednoho nebo dvou dnů před použitím. Tato inkubace neslouží k množení bakterií, ale jedná se spíše o jejich přizpůsobení. Účinnost těchto startérů byla pravděpodobně také zlepšena přidáním kvasinkových buněčných stěn. Tyto makromolekuly opravují toxické sloučeniny, jako jsou mastné kyseliny a pravděpodobně přidávají aktivační faktory. Avšak použití těchto startérů bylo příliš časově náročné a nespolehlivé. Základní výzkum byl vykládán ztrátou adaptace na vinné podmínky při izolaci kmenů z kvasícího vína. Bylo prokázáno, že mastné kyseliny a etanol inhibují růst a životaschopnost bakterií. Vlivy jako teplotní šok, etanol a mastné kyseliny a nízké pH mají za následek odpovědi od *O. oeni*. Na jedné straně je jejich přežití po tomto stresu lepší, když jsou do vína inokulované. Na druhé straně složení jejich membrány kolísá. Lze konstatovat, že jako u všech životaschopných buněk, *O. oeni* reaguje na změny životního prostředí. Byly provedeny výzkumy startérů k přímému použití a jejich přizpůsobení se v drsných podmínkách. *O. oeni* byl první malolaktický startér v mnoha vinařských oblastech. Jeho účinnost byla prokázána i přes některé nedostatky v některých vínech jako jsou kyselá bílá vína. [14]

3.1.1.4 Vliv jablečno-mléčného kvašení na organoleptické vlastnosti vína

Pokud jde o množství, není pochyb o tom, že transformace kyseliny jablečné je hlavním dějem v JMK. Celkový obsah kyselin je snížen a kyselina L-jablečná je nahrazena kyselinou L-mléčnou. Obojí má za následek ztrátu kyselosti nejen ztrátou ekvivalentních kyselin, ale také proto, že - silná nevyzrálá chuť kyseliny jablečné je nahrazena méně agresivní chutí kyseliny mléčné. Nicméně se objevují další jemné změny. Například některé rozmanité vůně vzniklé během alkoholového kvašení pomocí kvasinek po JMK mizí nebo se mění. To vysvětluje, proč je JMK výhodné pro většinu červených a bílých vín, kde ovocný charakter odrůd hroznů není podstatný. Tato vína jsou pro zlepšení vůně a chuti často podrobena zrání po dlouhou dobu v sudech a potřebují lahvové zrání pro dosažení jejich plnosti, na rozdíl od lehkých červených vín a některých bílých, které se vyznačují hroznovou chutí a jejich síla s JMK slábnou. [14]

Četné látky produkované BMK způsobují změny aroma vína během JMK. Avšak jen málo z nich je prozatím identifikováno. Jedním, pro smyslové změny z nejvýznamnějších je máselné aroma. To je přímo spojeno se zvýšenou koncentrací diacetylu, který se považuje za hlavního spoluúčastníka ve změnách aroma během JMK. Také acetoin má vliv na změnu aroma, ale jeho koncentrace může být vyšší než u diacetylu. Směsi obsahující diacetyl, acetoin a 2,3-butandiol jsou výsledkem metabolismu kyseliny citronové. Všechny heterofermentativní koky (*Leuconostoc*, *Oenococcus*) a fakultativně heterofermentativní laktobacily (*Lb. plantarum*, *Lb. casei*) ve víně rozkládají kyselinu citronovou. Během JMK *O. oeni*, který je dominantní, metabolizuje kyselinu citronovou pomaleji než odbourávání kyseliny jablečné. Počáteční koncentrace kyseliny citronové ve víně je asi 250-300 mg/l v závislosti na rychlosti JMK, konečná koncentrace mezi 0-100 mg/l. Avšak i po síření metabolismus dál funguje až do té chvíle, než je kyselina citronová úplně přeměněna. Hlavní produkty této degradace jsou kyselina octová a acetoin (C4 sloučenina), dvě skupiny látek významně ovlivňující chuť vína. [14]

Hromadění diacetylu, acetoinu a kyseliny octové ve víně se liší v závislosti na rychlosti JMK. Když je JMK rychlé, množství kyseliny octové, vyrobené z určitého množství kyseliny citronové, je poměrně vysoké a diacetyl a acetoin jsou v nízkých koncentracích. Naopak, když se bakterie pomaleji množí, je vylučováno méně kyseliny octové a diacetylu s acetoinem je produkováno více. Ne všechny změny v aroma, ke kterým došlo během JMK, jsou znakem metabolismu citrátů. Během JMK se sráží nebo podstupují strukturální změny

některé z fenolických sloučenin. JMK v sudech uděluje specifické úpravy, které se kombinují pro lepší stabilizaci barvy. [14]

3.1.2 Negativní význam bakterií mléčného kvašení ve víně

Činností mikroorganismů dochází také k poškození vín. Ta se projevují ve změnách některých složek vína a ve vytváření nových, vínu nežádoucích škodlivých látek. Náchylná jsou zejména vína, která mají některé nedostatky jako třeba nízký obsah alkoholu, nízký obsah kyselin. Má-li víno nedostatky, doporučuje se prevence před dalším možným nepříznivým vývojem. [9]

3.1.2.1 Zvýšení kyselosti vína

Ve většině případů, kdy je při výrobě vína dobře řízené rozmnožování BMK, následné biochemické reakce podporované BMK zlepšují kvalitu a stabilitu vína. Mohou však také víno znehodnotit a učinit je neprodejným. BMK fermentují sacharidy, zejména hexosy, které nebyly zcela zkvašeny kvasinkami. V této fázi se bakteriální populace skládá z heterofermentativních kmenů, zejména *O. oeni*. Kromě etanolu a CO₂, které mohou být produkovány kvasinkami, jsou hlavními produkty kvašení kyselina octová a D-kyselina mléčná. V důsledku toho se zvyšuje množství těkavých kyselin. V omezeném množství je víno více či méně znehodnoceno. Pokud těkavé kyseliny překročí hodnoty 1 g/l (vyjádřeno jako kyselina octová), je víno neprodejné. Množství kyseliny octové závisí na množství fermentovaných hexos a na celkové bakteriální populaci. [14]

3.1.2.2 Mléčné a manitové kvašení

Současně s mléčným kvašením probíhá také kvašení manitové. [24] Nazývá se též nečisté kvašení. [1] Jsou k němu náchylnější vína s nízkým obsahem veškerých kyselin, tříslovin a alkoholu. [1, 9] Vliv na výskyt tohoto poškození má vyšší teplota a zbytek neprokvašeného cukru, zejména v mladém víně. [24] Způsobují je homofermentativní mléčné bakterie přeměnou hroznového cukru na kyselinu mléčnou. Současně vzniká diacetyl, který dává vínu typickou vůni po kysaném zelí nebo okurkách. Heterofermentativní mléčné bakterie mohou z fruktosy tvořit chuťově nepříjemný manitol ve spojení s pachutí octovou a mléčnou. [23] Pro bakterie mléčného kvašení je nejvhodnější teplota pro rozmnožování

24 až 30 °C. Jejich činnost je zastavena vysokým obsahem alkoholu (14 %). [24] Postižená vína obsahují zvýšené množství těkavých kyselin. [9] Vyznačují se drsnou chutí i vůní připomínající kvašené zelí. [24] Proti této chorobě se lze bránit sířením moštů a nízkou kvasnou teplotou. [9] Preventivní ochranou je oddělování poškozených a nahnilých hroznů při jejich zpracování. Ve chvíli kdy, mladé víno dostává chuť i vůni po kyselině mléčné, je nutno jej přetočit do čistého a zasířeného sudu nebo jej scelit s vínem kyselým. Účinná je i pasterizace vína, tj. zahříváním na 65 °C. [24]

3.1.2.3 Zvrhnutí vína

Zvrhnutí vína je choroba postihující zejména červená vína. Vnější znakem této vady je změna barvy z červené na hnědou. Ztrátě intenzity barvy odpovídá množství kalů na dně nádoby. Současně se uvolňuje oxid uhličitý. Chuť i vůně vína se zhoršuje od mdlé na ostrou až odpornou, která znemožňuje víno konzumovat. [24] Choroba je způsobena rozkladem kyseliny vinné a dalších látek mléčnými bakteriemi. Vzniká celá řada produktů, hlavně kyselina octová a mléčná. [23] Vývoj tohoto postižení ovlivňuje i vyšší teplota. Ochrana před zvrhnutím spočívá v oddělování nahnilých hroznů i v silnějším zasíření červených rmutů při kvašení. Léčení takto postihnutých vín je složité. Slabě napadené víno je možné silně zasířit a scelit s vínem zdravým. Silně napadené víno se může zpracovat na vinný ocet nebo méně jakostní destilát. [24]

3.1.2.4 Myššina

V převážné míře je to typická choroba ovocných vín, v hroznových vínech se vyskytuje méně. [24] Patří mezi velmi nepříjemné choroby vína. Významně ovlivňuje aromatický a chuťový projev vína. [22] Myššina se projevuje zápachem po „myší moči“ a také s tóny zatuchlosti, připomínající dlouho nevětranou místnost. Spolehlivě se rozpozná kápnutím pár kapek vína na dlaň a po odpaření vína je na ruce cítit pach myšiny. Nejpravděpodobnějšími původci se považují mléčné bakterie rodu *Lactobacillus*, *Oenococcus* a druh *Leuconostoc mesenteroides*. Druhořadým původcem mohou být v chladnějších vinařských oblastech i kvasinky rodu *Brettanomyces*. Konzument nemusí tuto chorobu často vůbec zaznamenat. Často dochází k záměně myšiny s lehkou sirkou nebo s pachutí po kvasnicích. [22] Odporná chuť se projevuje po polknutí vína, na zadní části jazyka, někdy až po několika vteřinách. Bylo zjištěno, že ve starých vínech se myššina neobjevuje. [24] Myššina se nejčastěji vyskytuje u mladých vín se zbytkovým cukrem, s nízkým obsahem kyselin, u

kterých probíhalo kvašení při vysokých teplotách. Náchylná jsou i vína s lehkou oxidací, vína s vysokým pH a také vína, kde byla nedostatečná aplikace oxidu siřičitého během jejich výroby. [22] Mošty a mladá vína se mohou chránit dobrým sířením, případně kvašením pod kvasnou zátkou při nižších teplotách (18 °C) nebo také včasným přetočením mladého vína z kvasných kalů. [24] Tato choroba je z vína neodstranitelná. Jen při velmi slabém projevu choroby můžeme použít lehké zasíření vína a filtraci. Může se také aplikovat metoda přidání zdravých kvasnic do vína v dávce 5 l/ hl, případně i nové překvašení. [22, 24] Pachuť po mléčných bakteriích

Mléčné bakterie se podílejí na biologickém odbourávání mnohých kyselin. V průběhu tohoto procesu vzniká mnoho vedlejších produktů, které mohou způsobovat snižování kvality vína. [22]

3.1.2.5 Tvorba biogenních aminů

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární organické báze často nalezené ve víně a jiných fermentovaných potravinách. [25] Některé kmeny bakterií mléčného kvašení dekarboxylují aminokyseliny, především histidin, tyrosin, arginin, ornitin a lysin a mohou z nich vyprodukovat biogenní aminy (BA). Hlavními BA identifikovanými ve víně jsou histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, metylamin, ethylamin, isoamylamin a fenylethylamin. První tři jsou nejčastější. [26, 27, 28] BMK jsou hlavními činiteli ve víně schopným dekarboxylovat aminokyseliny a produkovat tak biogenní aminy. Tyto sloučeniny mohou mít toxický efekt, pokud jsou požitý ve velkém množství. [27] Některé aminy, jako například putrescin, mohou již být přítomny na hroznech. Za přítomnost vysoké koncentrace putrescinu v rostlinách může nízký obsah draslíku v půdě. [29]

Obecně jsou BA nežádoucí ve vysokých koncentracích díky svým negativním fyziologickým účinkům při vstřebávání. [26] Mohou vyvolat bolesti hlavy, respirační problémy, tlukot srdce a alergické reakce. Histamin je amin způsobující v potravinách hodně otrav, díky jeho silné biologické aktivitě je jedním z nejtoxičtějších. [25, 30] Způsobuje bolesti hlavy, nízký krevní tlak, bušení srdce, zvracení, průjem. [26] Předmětem studia histaminu je zejména přítomnost alkoholu a ostatních aminů, které podporují jeho účinky v potlačení lidských detoxikačních systémů. Vysoká koncentrace histaminu ve víně je způsobena především přítomností histidindekarboxylázy některých bakterií mléčného kvašení. Aby se zabránilo syntéze histaminu, je velmi důležité identifikovat a charakterizovat bakterie, kte-

ré jsou schopny jej ve víně produkovat. [25] V souvislosti s kažením vína s vysokou hladinou histaminu je spojován *Pediococcus*, avšak jeho přítomnost ve víně, bývá zpravidla nízká. [25, 28] V posledních letech bylo zjištěno, že i některé kmeny *Oenococcus oeni* jsou odpovědné za hromadění histaminu ve víně. Histamin mohou dále produkovat některé kmeny *Lactobacillus buchneri*, *Lb. hilgardii*, *Pediococcus parvulus*. [25]

Putrescin a kadaverin jsou další biogenní aminy, které se mohou vyskytovat ve víně. [29] Putrescin, nejhojnější biogenní amin ve víně, je produkován kmeny *Oenococcus oeni* dekarboxylací ornitinu, ale také z argininu. V tomto případě může putrescin pocházet z kmenů, které vlastní kompletní enzymatický systém na převedení argininu na putrescin nebo z metabolických společenství, která vymění ornitin mezi kmeny schopnými metabolizovat arginin na ornitin, ale neschopnými produkovat putrescin a kmeny které jsou schopny produkovat putrescin z ornitinu, ale nejsou schopné jej rozkládat na arginin. Produkce putrescinu tímto společenstvím se objevuje, jakmile je jablečno-mléčné kvašení dokončeno. Vysoká koncentrace putrescinu bývá ve víně často zjištěna, a to zejména v červeném víně. [30] Tvorba putrescinu je spojována i s *Lactobacillus buchneri*. [28] Tyramin ve víně produkují zejména kmeny *Lactobacillus brevis* a *Lb. hilgardii* ale také *Leuconostoc*. [28, 31]

3.2 Rod *Leuconostoc*

Tento rod bakterií zahrnuje tři nejvýznamnější poddruhy: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* a *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Dříve byly považovány za samostatné tři rody. [32] Bakterie z rodu *Leuconostoc* jsou mezofilní koky s optimem růstu v rozmezí teplot 18 °C až 25 °C. Některé kmeny jsou schopny růst i při nižších teplotách než 10 °C. Mikroskopicky se jeví kokovitě, některé dokonce jako krátké tyčinky. Morfologie buněk je závislá na konzistenci kultivačního prostředí (tekuté versus pevné). [33] Je to heterofermentativní, grampozitivní bakterie. Rozdílly mezi jednotlivými kmeny spočívají v množství vzniklých netěkavých a těkavých kyselin. Tento rod rozkládá kyselinu jablečnou a kyselinu citronovou na kyselinu mléčnou, kyselinu octovou a další produkty. Rozklad kyseliny jablečné probíhá nejlépe při teplotě 25 °C. Snížená, nebo zvýšená teplota zpomaluje růst a množení BMK. [21] Přítomnost *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* je vždy ve víně a nealkoholických ovocných šťávách nežádoucí. [32] *Leuconostoc* zahrnoval do roku 1995 i druh *L. oenos*. Ten měl však malou příbuznost

z hlediska RNA/DNA hybridizace s jinými leukonostoky. Molekulární přístup k taxonomii založený na analýze 16S r-DNA a 23S r-DNA vedl k vytvoření nového rodu *Oenococcus*. [20]

3.3 Rod *Oenococcus*

Vinné bakterie patřící k rodu *Oenococcus* byly dříve klasifikovány jako *Leuconostoc gracile*, *Leuconostoc citrovorum* a *Leuconostoc oenos*. Pozdější fylogenetické studie odhalily, že *L. oenos* zastupuje jiný druh, oddělený z jiných *Leuconostoc* spp. Tyto výsledky měly za následek taxonomické převedení této bakterie do nového rodu *Oenococcus*. [2] Tento rod byl zaveden v roce 1995. Svými vlastnostmi se tento rod podobá rodům *Weissella* a *Leuconostoc*. Existuje však několik fyziologických rozdílů od rodu *Leuconostoc* a rodu *Weissella*. Liší se především tolerancí ke kyselému prostředí. [33]

Rod *Oenococcus* zahrnuje pouze jeden druh *O. oeni*. Je nepatogenní a nachází se v hroznovém moštu a víně. [42] Jedná se o nutričně náročný organismus vyžadující dostatek živin, komplexní organické prostředí, včetně vitaminů, aminokyselin a malé množství sacharidů. Základní faktory ovlivňující růst této populace jsou pH, teplota, obsah alkoholu, zvýšený obsah cukru, dostatek živin a hladina oxidu siřičitého. [34] *O. oeni* je popisován jako grampozitivní, nepohyblivý kok, nesporulující, fakultativně anaerobní, kataláza i oxidáza negativní. Elipsoidní až sférické koky bývají uspořádány do řetízků, obvykle se vyskytují po dvou. Buňky mohou být obtížně odlišitelné od krátkých tyčinek laktobacilů. [19] Jsou neproteolytické, nehemolytické, rostou při pH 3,5 až 4,8 jsou acidofilní. [42] Je to jedna z nejméně etanol tolerantních bakterií ze všech bakterií mléčného kvašení. Může růst i v prostředí s 10 % etanolu. [33] V tekutém médiu je růst pomalý, na agaru je podpořen kultivací v atmosféře s 10% CO₂. Kolonie jsou rozeznatelné po 5 dnech a jejich průměr je do 1 mm. Rostou při teplotě 20 až 30 °C s optimem 22 °C. [42]

O. oeni je heterofermentativní druh, který fermentuje glukosu na D-kyselinu mléčnou, CO₂ a etanol nebo acetát. Bakterie vytváří plyn z glukosy, hydrolyzují eskulin, z glukosy vytváří D-kyselinu mléčnou, manitol z fruktosy a mohou produkovat amoniak z argininu. Ačkoli se k tomuto rodu přiřazuje pouze jeden druh *O. oeni*, patřící k heterogenní skupině dokládající širokou proměnlivost v kvašení specifických sacharidů. Většina kmenů *O. oeni* využívá L-arabinosu, fruktosu a ribosu, ale ne galaktosu, laktosu, maltosu, rafinosu nebo

xylosu. Rozpory v kvašení cukrů jsou pravděpodobně výsledkem kmenových charakteristik. [19]

O. oeni převládá ke konci etanolového kvašení a po alkoholovém kvašení. Původní mikroflóra vína obsahuje různé kmeny *O. oeni* a to udává specifickou citlivost k bakteriofágovým infekcím. [20] *O. oeni* má v moštu schopnost metabolizovat kyselinu jablečnou na kyselinu mléčnou přes jablečno-mléčné kvašení. I když jsou i jiné druhy z BMK prozkoumány a používány jako startéry pro jablečno-mléčné kvašení, kmeny *O. oeni* produkují žádoucí výsledky v přijatelný čas pro vinaře. [19].

3.3.1.1 Genotypová analýza a vývoj *O. oeni*

Pomocí pulzní gelové elektroforézy byly vytvořeny podrobné fyzikální mapy genomu dvou kmenů *O. oeni*, a to PSU-1 a GM. Oba genomy si jsou velmi podobné, rozdílné jsou jejich výsledné mutace. V PSU-1 chybí geny související s metabolismem xylosy a sacharosy. Z toho se usuzuje, že *O. oeni* není schopen metabolizovat tyto sacharidy. Mimo to v PSU-1 chybí geny podílející se na syntéze několika aminokyselin, jako jsou arginin, leucin, valin, tryptofan, metionin, izoleucin nebo histidin. Proto jsou pro jeho růst arginin a izoleucin nezbytné. Fylogenetické stromy sestavené na základě analýzy ribozomálních proteinů a podjednotek RNA polymerázy potvrdily, že *O. oeni* se rozvíjí rychleji než ostatní leukonostoky. Jedním z možných vysvětlení je skutečnost, že *O. oeni* PSU-1 ztratil některé geny. Zároveň bylo zjištěno, že *O. oeni* PSU-1 dokáže růst v prostředí s glukosou, fruktosou, ribosou, trehalosou a celobiosou, stejně tak je schopen přeměňovat fruktosu na manitol. Zpočátku byl růst pozorován i v sacharose, laktose, maltose a rafinose, nicméně když byly experimenty provedeny o dva roky později, kmen tuto vlastnost ztratil. Vzhledem k rychlé mutační schopnosti druhu, je pravděpodobné, že tyto funkce byly ztraceny spontánní mutací nebo byly původně zakódované na plasmidech a později došlo k jejich ztrátě. Zatímco aktuální izolát kmenu *O. oeni* PSU-1 nevlastní žádné plasmidy, mnoho jiných *O. oeni* tyto DNA molekuly obsahují. [35]

3.4 Rod *Weissella*

Rod *Weissella* zahrnuje kulovité čokkovité, nebo nepravidelné tyčinky. Jedná se o heterofermentativní druhy, které produkují D, L-kyselinu mléčnou. Tento rod zahrnuje kolem 12

popsaných druhů, ale pouze jeden druh tohoto rodu byl izolován z moštu a vína. Je jím *W. paramesenteroides*. Tento druh tvoří D-kyselinu mléčnou z glukosy. [35]

3.5 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* je schopný způsobovat různé typy kvašení. Fermentuje glukosu na kyselinu máselnou, kyselinu octovou a etanol, fruktosu na manitol. Optimální teplota růstu pro tuto bakterii je 22 °C, ale může růst dokonce i při teplotě 8-10 °C. [21] Laktobacily jsou grampozitivní, nepohyblivé nebo vzácně pohyblivé bakterie. [35] Mikroskopicky se projevují jako dlouhé tak i krátké tyčinky nebo dokonce kokobacily. [21] Mají tendenci tvořit řetízky, tato schopnost se však liší mezi druhy a dokonce i kmeny. Záleží na fázi růstu a pH média. Maximální pH pro jejich růst je 7,2. Tolerují kyslík nebo žijí anaerobně. Délka a zakřivení tyčinek závisí na tenzi kyslíku. U několika málo druhů se vyskytují bičíky po celé buňce. Mají velké nutriční požadavky na sacharidy, aminokyseliny, peptidy, mastné kyseliny, deriváty nukleových kyselin a minerální látky. Zdrojem energie je pro ně přeměna karbamoyl fosfátu na CO₂ a NH₃ během rozkladu argininu. [35] *Lactobacillus* spp. jsou buď homo- nebo heterofermentativní BMK. [19] Mezi homofermentativní druhy izolované z vína patří: *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. sake*, *Lb. homohiochii* a heterofermentativní *Lb. brevis*, *Lb. hilgardii*, *Lb. fructivorans*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum*. [19]

Další druhy izolované z hroznů a vína po celém světě zahrnují druhy: *Lb. cellobiosus*, *Lb. curvatus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. diolivorans*, *Lb. jensenii*, *Lb. kunkeei*, *Lb. leichmanni* *Lb. paracasei*, *Lb. trichodes*, *Lb. vermiforme*, *Lb. yamanashiensis*. [19, 36] Nedávná evidence měla za následek změny v taxonomii laktobacilů. Týká se *Lb. Cellobiosus*, ten je v současné době považován za synonymum *Lb. fermentum* a *Lb. leichmanni* je teď popisován jako *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*. Pro *Lb. trichodes* a *Lb. heterohiochii* je nyní synonymum *Lb. fructivorans*. Některé studie popisující *Lb. vermifore* nejsou jasné v tom, zda bakterie představuje oddělený druh, nebo je synonymem pro blízkce příbuzný druh *Lb. hilgardii*. [19]

Laktobacily se běžně vyskytují v mnoha typech vína, přestože je v něm vysoká hladina etanolu, nízké pH 3,2-3,8 a přítomný přidaný SO₂. Mohou mít veliký vliv na kvalitu vína. Pokud jsou přítomné ve vysokém počtu, způsobují kombinaci rozmanitých typických nedostatků vína, které závisí na přítomném druhu. Jejich schopnost metabolizovat organické kyseliny jako kyselinu jablečnou, citronovou a vinnou může finální produkt ovlivnit zá-

doucím i nežádoucím způsobem. Ve vínech s nízkým obsahem kyselin je tento proces škodlivý a musí být kontrolován. Rozklad kyseliny vinné ve víně je obvykle spojován s vážným zkažením vína. Tuto reakci vykonává jen pár druhů homofermentativních a heterofermentativních laktobacilů, například *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*. Další efekt laktobacilů ve víně je jejich odpovědnost za produkci diacetylu z kyseliny citronové. Diacetyl je látka, která zvyšuje chuť, pokud jsou přítomné bakterie v malém počtu, pokud jsou však v přebytku, stávají se příčinou kažení. Způsobuje hořkost, která se vyskytuje spolu s nadměrnou tvorbou manitolu při kvašení fruktosy a také příležitostně vločkovatění způsobené růstem *Lb. trichodes*. [37]

Lactobacillus plantarum tvoří tyčinkovité buňky délky 4 μm a šířky 0,6 – 1,0 μm . Buňky se vyskytují jednotlivě nebo jenom v krátkých řetězcích s tendencí k tvorbě shluků. Nachází se v mléčných výrobcích a také v přírodě, zejména na rostlinách. Odtud pochází jeho druhový název. Jedná se o organismus mikroaerofilní a homofermentativní. Produkuje téměř výhradně kyselinu mléčnou a pouze necelé 3 % těkavých kyselin, převážně kyseliny octové. [32, 35] Ve víně tedy rozkládá kyselinu vinnou na kyselinu octovou a oxid uhličitý. Také rozkládá glycerol na octovou a mléčnou kyselinu a CO_2 . [21] Může být někdy použit jako startovací kultura při výrobě vína. Rozklad kyseliny vinné může být způsoben i jinými BMK. [35]

3.6 Rod *Pediococcus*

Pediococcus je skupina homofermentativních bakterií, při zkvašování sacharidů tvoří jenom kyselinou mléčnou. Jejich optimální pH pro růst je kolem 5 – 5,8. Poměrně dobře snášejí velmi široké teplotní rozmezí od 5 do 45 °C. Tyto bakterie se často seskupují do čtveřic neboli tetrád. [21, 32] Buňky jsou kulovité, nepohyblivé a netvoří spory. Glukosa je fermentována Embden-Meyerhof-Parnasovou dráhou na D, L-laktát. Používá široké spektrum sacharidů jako hexosy, pentosy, disacharidy, trisacharidy a polysacharidy jako třeba škrob. [35] Jejich původním stanovištěm jsou rostliny a z nich se dostávají do příslušných potravin. V některých jsou nežádoucími, v jiných jsou součástí fermentační mikroflóry. Často se vyskytují ve společenství se streptokoky, leukonostoky a laktobacily. [17] Všechny druhy vyskytující se ve víně rostou pouze v přítomnosti sacharidů. [35]

Ve víně se vyskytují zejména druhy: *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, *P. damnosus*, *P. inopinatus*. [3,35] Pokud jsou pediokoky přítomny ve víně v přiměřeném množství zúčastňují se

odbourávání dikarboxylové kyseliny jablečné malolaktátovým enzymem na monokarboxylovou kyselinu mléčnou a CO₂. Tím se ve víně snižuje obsah kyselin. Při nepřiměřeném množství mohou produkovat nevíтанý acetoin a z něho diacetyl. [17]

Pediococcus cerevisiae působí ve víně negativně. Způsobuje vláčkovatění. Do nežádoucího počtu se může přemnožit ve vínech s nízkým obsahem kyselin a vyšším zbytkem cukru. Poznáme je podle vysoké viskozity vína a při zamíchání se pohybujícího jemného zákalu. Víno postihnuté touto nemocí lze napravit silným provzdušněním při stáčení, přetočením do silně zasířeného sudu a překvašením zdravými kvasnicemi. [23]

Pediococcus pentosaceus jsou grampozitivní kokovité bakterie o průměru 1,0 až 1,3 μm. Tyto bakterie se nejnáze kultivují na půdě s obsahem kvasničné vody nebo kvasničného autolyzátu či dokonce přímo v pivě. Na pevných půdách je jejich růst velmi pomalý, neboť kolonie mohou být pozorovány až za 4-6 týdnů po zaočkování. V tekutých půdách je jejich růst rychlejší. Nejvhodnější teplota pro růst je 25°C a optimální pH 5,8. Při hodnotě pH 7,1 už nerostou. Doporučuje se je kultivovat při vyšší koncentraci CO₂, který příznivě ovlivňuje jejich rozmnožování. [32]

4 BAKTERIE OCTOVÉHO KVAŠENÍ

Všudypřítomné bakterie octového kvašení (BOK) spadají do čeledi *Acetobacteraceae* a jsou dobře přizpůsobeny na různé množství cukru a etanolu v prostředí. [38] Přítomnost všech BOK bývá nežádoucí, jedná se totiž o původce kažení. [15] Ve vinařství představuje jejich schopnost přeměnit etanol přes acetaldehyd na kyselinu octovou poškození vína. Vína zkažená BOK jsou charakteristicky těkavá. Chutnají kysele jako ocet, snižují ovocný charakter. Taková vína mají nízkou komerční hodnotu. [38]

Hrozny a víno jsou pro octové bakterie předmětem kažení v mnoha fázích výroby. Fyzicky poškozené hrozny nebo nakažené plísněmi se mohou infikovat BOK a nemohou být použity k výrobě vína, pokud těkavá kyselost překračuje zákonné limity. Růst BOK může také nastat v moštu během kvašení vystavenému vzduchu. Nejběžněji jsou vína nakažena BOK během zrání a uskladnění, kdy jsou neúmyslně vystaveny vzduchu. Bakteriální kažení se vyskytuje i u balených svisle vzpřímených lahví. Tento vizuálně patrný zřetelný prstenec bakteriální biomasy je vsazený na krku lahve na rozhraní vína a prázdného místa se vzduchem. (Obr. 2) [38]

Prevence proti rozšíření BOK a kažení vína je založeno na znalosti, že tyto bakterie jsou aerobní a požadují kyslík pro svůj růst. Takovému růstu může být v praxi zabráněno překrytím vína neutrálním plynem jako je oxid uhličitý. [38] Pro BOK je optimální pH 5,5-6,3, nicméně mohou přežít a růst i při nižším pH vína okolo pH 3,0 - 4,0. Optimální teplota jejich růstu je 25 - 30 °C, některé kmeny mohou velmi pomalu růst i při 10°C. [35]

Čeď *Acetobacteraceae* se skládá z 15 rodů, z nichž tři *Acetobacter*, *Gluconobacter* a *Gluconacetobacter* jsou spojovány s hrozny a kažením vína. Zásluhou rozdílné tolerance k etanolu jsou druhy *Acetobacter* častěji izolovány z vína, zatímco druhy *Gluconobacter* a *Gluconacetobacter* bývají izolovány z moštu. *Gluconobacter oxydans* je hlavní druh ve spojení s hrozny a moštem. *Gluconobacter hansenii* a *Gluconacetobacter liquefasciens* mohou být občas izolovány během výroby vína. Dva nejčastější druhy ve víně z rodu *Acetobacter* jsou *A. aceti* a *A. pasteurianus*, nově také *A. oeni* izolovaný hlavně z červeného vína. Hlavní charakterizující rysy rodů *Acetobacter* a *Gluconobacter* je jejich schopnost oxidovat kyselinu octovou na CO₂. Druhy *Acetobacter* jsou schopny oxidovat etanol na kyselinu octovou a potom na CO₂ a vodu, zatímco druhy *Gluconobacter* nemají kompletní citrátový cyklus a nemohou oxidovat etanol více než na kyselinu octovou. [38] *Glucono-*

bacter oxydans se nachází zejména v prostředí s vysokou koncentrací cukrů, kde je alkohol v nízkých koncentracích nebo kde zcela chybí. [19]



Obr. 2. Prstenec bakteriální biomasy na krku lahve na rozhraní vína a prázdného místa se vzduchem. [38]

4.1 Octové kvašení

Octové kvašení je nejběžnější choroba vína. Je způsobena činností octových bakterií. Zvýšený obsah kyseliny octové je lehce zjištělný svou charakteristickou octovou příchutí. K naoctění jsou náchylná vína s nízkým obsahem alkoholu a také mu podléhají vína, která byla lisována z narušených hroznů nebo vína vyrobená ze rmutu, ke kterému byl delší přístup vzduchu. [9] Zvýšené nebezpečí naoctění je u červených rmutů a vín. Rmut je vystaven oksylování v průběhu jeho kvašení v otevřených nádobách. [13] Postižené víno je třeba především silně zasířit. [9] Preventivním opatřením je absolutní čistota v lisovně i ve sklepě. Kyselina octová se nedá z vína odstranit. Nedoporučuje se ani scelovat s vínem zdravým, protože nežádoucí proces by pokračoval v celém objemu. Pokud je víno slabě

naoctělé, je možno ho použít k výrobě destilátu. Nádoby, v nichž bylo naoctěné víno, musí být dobře mechanicky vyčištěny a vypláchnuty roztokem horké sody. Poté vypláchnuty několikrát vodou studenou a po odkapání mírně zasířeny. [13]

4.2 Těkavé kyseliny

Původcem této choroby vína jsou kromě bakterií mléčného kvašení i bakterie octového kvašení. Těkavé kyseliny není možné z vína odstranit jednoduše, aniž by se výrazně nepoškodila kvalita vína. Pokud octové bakterie přineseme z vinice na hroznech, musíme napadené hrozny vytřídit a ihned znehodnotit. Tyto hrozny se nesmí sklízet spolu se zdravými hrozny a ani dále s nimi zpracovávat. Za tvorbu těkavých kyselin, zejména kyseliny octové, jsou zodpovědné tyto druhy BOK: *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter aceti*. Tvorba kyseliny octové se zvyšuje při oxidaci a tvorbě křísu, rychlým rozmnožováním původců kyseliny octové v nezasířených vínech a také v hroznech napadených hnilobami. Výskytu této choroby lze předcházet zpracováním kvalitních a zdravých hroznů. Současně je nutná sanitace veškerého zařízení vinného sklepa. Kvašení moštů, u kterých se může předpokládat výskyt těkavých kyselin, se nechá proběhnout za sníženého přístupu vzduchu. Vína s vyšším obsahem alkoholu jsou méně náchylná k tvorbě těkavých kyselin. [22]

5 KVASINKY

Kvasinky jsou nejvýznamnější skupinou mikroorganismů při výrobě vína, protože bez *Saccharomyces* by nebylo možné vyprodukovat kvalitní víno. Kromě *Saccharomyces* je během kvašení vína přítomno mnoho dalších rodů a druhů kvasinek, které mají dopad na kvalitu vína, a to jak pozitivní, tak i negativní. [19] Kvasinky související s výrobou vína dělíme do dvou kategorií, na rod *Saccharomyces* a na ostatní rody kvasinek. [12] Nízké pH vína a vysoký obsah cukrů rychle vytváří anaerobní podmínky. Přítomnost fenolických sloučenin vytváří ideální prostředí k podpoření růstu kvasinek. Jejich metabolická aktivita může intenzivně působit na složení vína a na jeho charakteristickou vůni a chuť. Kvasinky pochází z hroznů, vinařského vybavení, mohou být rozšířeny hmyzem jako třeba mouchami, včelami, vosami nebo větrem. Mohou pocházet také z přímé inokulace využívající komerční preparáty kvasinek. Rozsah jejich rodové a druhové odlišnosti je ovlivněn podmínkami výroby vína. Například držením moštu při nízké teplotě se zvyšuje extrahování kvasinek ze slupek hroznů, to vede k rozvoji druhů kvasinek tolerantních k nízké teplotě. [35]

Kvasinky hrají významnou roli v kažení jídla a nápojů, jako je třeba právě víno. Pár druhů zodpovědných za kažení může přežít a růst ve stresujících podmínkách, kde jim nekonkurují ostatní mikroorganismy. Je velmi důležité monitorovat a kontrolovat obsah kvasinek ve víně. [39] Kvasinka *S. cerevisiae* může víno kazit, pokud roste v době, kdy je její růst nežádoucí, např. v lahvích polo-sladkého vína. Kromě toho se mohou kvasinky jako *Kloeckera apiculata* a *Metschnikowia pulcherrima* řadit taktéž ke kazícím činitelům vína. Tyto organismy mohou produkovat vysoký obsah aromátů, jako jsou kyselina octová, ethylacetát, diacetyl. [5]

5.1 Alkoholové kvašení

Alkoholové kvašení je základním a nejdůležitějším biochemickým procesem při výrobě vín. Vzniká během něj alkohol na základě přeměny cukrů a oxid uhličitý, v jeho průběhu se vytváří i mnoho dalších sloučenin. Je způsobeno mnoha druhy kvasinek. Základem při výrobě vína jsou *Saccharomyces cerevisiae* (vinné kvasinky). Alkoholové kvašení moštu je složitý biochemický proces, na kterém se může podílet několik rodů kvasinek: *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Zy-*

gosaccharomyces. [22] Kvašení vína může být rozděleno na dva typy, přímo inokulované a neinokulované. Neinokulované se také nazývá domorodá vegetace, spontánní nebo také přírodní kvašení. [35] Kvasinky se rozmnožují přímo na bobulích ve vinici. Vyskytují se na révě vinné v místech, kde na slupce vznikají drobné trhlinky, kterými vytéká mošt s cukrem a také v místech, kde přisedá stopka na vlastní bobuli. V normálních podmínkách je jich dostatek, aby proběhlo spontánní kvašení. [22] Tyto kvasinky zahajují přeměnu hroznové šťávy na víno. Jak dlouho se budou množit zástupci ostatních rodů kvasinek závisí na podmínkách výroby vína. [35]

Inokulací kvasinek se rozumí použití řízeného kvašení vín, neboli aplikace čisté kultury kvasinek a řízení teploty průběhu kvašení. [22] V obou případech následuje rozmačkání hroznů a v moštu se zvýší jejich koncentrace. [35] Sterilním rozmačkáním zralých hroznů se v moštu získá populace kvasinek pohybující se v rozmezí $10^3 - 10^5$ CFU/ml. [4, 40]

Tab. 3. Růst kvasinek během přírodního kvašení. [6]

Fáze kvašení	Obsah etanolu (% V/V)	Typické kvasinky
Časná (1-3 den)	0-3	<i>Kloeckera apiculata</i> <i>Hanseniaspora valbyensis</i>
Střední (3-5 den)	3-5	<i>Candida stellata</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i> <i>Kluyveromyces spp.</i> <i>Pichia spp.</i>
Pozdní (4-10)	5-12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Na začátku kvašení dominují *Kloeckera apiculata* a *Hanseniaspora*, které tvoří 50 – 70 % populace (Tab. 3). V menším množství jsou přítomny i rody *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia* a *Kluyveromyces*. Rody *Saccharomyces* se vyskytují v nízkých počtech. Populaci ovlivňuje mnoho faktorů zahrnující klima, počasí, čas sklizně, znečišťující látky atd. Během kvašení roste množství životaschopných kvasinek až na $10^8 - 10^9$ CFU/ml. Při nepřítomnosti startovací kultury byly zjištěny různé druhy *Kloeckera*, *Hanseniaspora*,

Candida, *Pichia*. Tyto rody odumírají během 2-3 dnů od začátku kvašení a jsou nahrazovány zástupci rodu *Saccharomyces*, které jsou schopny odolat rostoucí koncentraci alkoholu. [4]

5.2 Vady vín způsobené kvasinkami

Jako následek metabolismu kvasinek jsou produkovány. Množství esterů závisí na druhu kvasinek. Domorodé nebo divoké kvasinky druhů *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima* a *Hansenula anomala* jsou potenciální producenti esterů, podobně jako druhy *Brettanomyces*. Esterové kažení je spojováno zejména s přítomností vysoké koncentrace ethyl acetátu, ale i další podobné látky mohou přispět k problémům. [40]

Křís vzniká ve vínu, které má styk se vzduchem. Způsobují jej nejčastěji následující druhy kvasinek: *Pichia membranefaciens*, *Pichia fermentans*, *Candida vini*, *Candida zeylanoides*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Debaryomyces hansenii*. [9, 22] Většinou jsou tyto kvasinky již na hroznu z vinice, ale může jimi být infikován i hroznový mošt, rmut nebo mladé víno v lisovně a kvas ve sklepě. [13] Tyto kvasinky rozkládají alkohol, kyseliny i extrakt za tvorby těkavých kyselin a esterů. Rozklad pokračuje až do vzniku oxidu uhličitého a vody. Na povrchu vína se objevuje bílý, nebo špinavě-žlutý povlak (křís). [9] Čím více je víno napadeno, tím je povlak silnější. Bílé víno zhnědne a červené ztratí svou intenzivní barvu a získá nahnědlou barvu. [13] Proti křísu se bojuje zamezením přístupu vzduchu k vínu, a to řádnou dolévkou a sířením. [9] Velice důležité je také skladovat víno při správné teplotě. Teploty nad 20°C podporují rozvoj těchto kvasinek a s tím i tuto chorobu vína. [22] Víno, které má více jak 12,5 objemových procent alkoholu, touto nemocí netrpí. [13]

6 PLÍSNĚ

Plísně jsou běžně přítomné na hroznech a to ve velké rozmanitosti rodů. Infikují kořeny, listy i bobule révy vinné. [19, 41] Jsou všudypřítomné uvnitř vinic, na povrchu půdy i ve vzduchu. Běžnými příklady jsou *Aspergillus*, *Botrytis* a *Penicillium* v menším rozsahu *Phytophthora*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Ucinula*. Bobule bývají infikovány i patogenními plísněmi *Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola*. Plísně hrají významnou roli ve fyzikální a chemické stabilitě, stejně tak jako v senzorigickém charakteru budoucího vína. [12, 19, 41] Pokud jsou hrozny napadeny hnilobou už ve vinici, znamená to pro kvalitu hroznů velký problém. Nejběžnější vyskytující se hniloba na hroznech v průběhu dozrávání je šedá hniloba. K napadení může dojít už v době kvetení révy vinné, kdy se stopky květů pokryjí šedým povlakem houby. Tuto chorobu způsobuje plíseň *Trichothecium roseum* (*Botrytis cinerea*). Je pravděpodobně zdrojem mykotoxinů, např. trichothecinu. Nicméně mykotoxiny jsou málokdy detekovány ve víně. [22, 41] Největší obavy pro hroznové produkty představuje mykotoxin ochratoxin A. Ochratoxin A (OA) je většinou produkován, když *Aspergillus carbonarius* infikuje bobule hroznů před sklizní. OA může produkovat také *A. niger*, tento druh patří k nejčastěji se vyskytujícím na hroznech z rodu *Aspergillus*. Příležitostně je z hroznů izolován i *A. ochraceus*. Kmen *Penicillium expansum*, izolovaný z hroznů, může produkovat patulin. Druhy jako *A. flavus* a *A. parasiticus* mohou být také příležitostně izolovány z hroznů. [41]

Nekontrolované rychlé rozmnožování plísní na hroznech v době sklizně vede k růstu sekundárních kontaminantů (kvasinek, bakterií), které tak mohou mít vliv na zhoršující jakost vín. [19] Víno napadené plísní získává nepříjemnou příchuť po plísní. Tuto pachut' může víno získat i od plesnivého sudu, cisterny, dřevěné kádě a dalších nástrojů. [13]

ZÁVĚR

Práce se zabývala mikroorganismy ve víně. V práci byl stručně popsán princip výroby vína a jeho složení. Převážná část byla věnována výskytu bakterií mléčného kvašení a ostatních mikroorganismů, jako jsou bakterie octového kvašení, kvasinky a plísně. V práci byl popsán jejich vliv na kvalitu vínu.

Bakterie mléčného kvašení mohou být ve víně jak žádoucí i škodlivé. Záleží na jejich množství, času výskytu a druhu. Jejich největším přínosem pro víno je jablečno-mléčné kvašení. Tento proces je způsobován několika druhy, nejvhodnějším je však *Oenococcus oeni*. Jablečno-mléčné kvašení pozitivně ovlivňuje organoleptické vlastnosti vína. Nejvýznamnější je snížení celkového obsahu kyselin a přeměna kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou. Obojí má za následek ztrátu kyselosti. Činností těchto mikroorganismů může docházet také k poškození vín. To se projevuje změnou některých složek vína a vytváření nových, vínu nežádoucích škodlivých látek. Například rody *Lactobacillus*, *Oenococcus* a druh *Leuconostoc mesenteroides* způsobují myšinu, která negativně ovlivňuje aromatický a chuťový projev vína. Velmi nepříznivě na víno působí také tvorba biogenních aminů, toho se účastní zejména rody *Pediococcus* a některé kmeny *Oenococcus oeni*. Hlavními biogenními aminy detekovanými ve víně jsou histamin, tyramin, putrescin. Jsou nežádoucí díky svým negativním fyziologickým účinkům na člověka.

Kvasinky jsou rovněž významnou skupinou mikroorganismů ve víně, a to zejména kvasinka *Saccharomyces*, která spolu s dalšími druhy zahajuje alkoholové kvašení. Stejně jako u bakterií mléčného kvašení, tak i u kvasinek je u některých druhů vliv na víno negativní. Mohou produkovat estery, nebo tvořit křís, čímž kvalitu vína snižují.

Výskyt plísní a bakterií octového kvašení je ve víně nežádoucí.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KADLEC, Pavel , et al. *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha : VŠCHT Praha, 2008. Skripta. ISBN 9788070805107. Vinařství, s. 182-194.
- [2] ČEPIČKA, Jaroslav, et al. *Obecná potravinářská technologie*. 1. vyd. Praha : Premisa, 1995. Skripta. ISBN 8070802391. Vinná Réva, s. 200-207.
- [3] K. ESTREICHER, Stefan. *Wine : from Neolithic times to the 21st century*. [s.l.] : Algora Publishing, 2006. ISBN 0875864775. In the beginning, s. 3.
- [4] ICMSF. *Micro-organisms on foods 6 : Microbial ecology of food commodities*. [s.l.] : By Kluwer Academic, 2005. 2. ISBN 0-306-48676-8. Fermented beverages, s. 716-723.
- [5] JACKSON, Ron S. *Wine Science*. third edition. London : Elsevier, 2008. 751 s. ISBN 978-0-12-3736-16-8.
- [6] Robinson, Richard K. *Encyclopedia of Food Microbiology, Volumes 1-3*. (pp: 2306,2307-2310). Elsevier,2000. ISBN.9780122270703
- [7] HAUFT, Jindřich . *Nový breviář o víně*. 2. vyd. Ing. Božena Procházková, Jiří Winter-Neprakta. Praha : SVÉPOMOC, 1989. Stručně o výrobě vína, s. 32.
- [8] ŠEVČÍK, Libor. *Hledání pravdy o víně: Červená vína* . 2. upr. vyd. Alice Pištěková, Danuše Martinová. Praha : Grada Publishing a.s., 2003. ISBN 80-247-0639-3. Co vlastně je víno , s. 111-112.
- [9] KOHOUT, František. *O víně*. 1. vydání. Praha : Merkur, 1982. ISBN 5138782. s. 65-71.
- [10] *Rozdělení vín v České Republice* [online]. Národní vinařské centrum, o.p.s. , c2005-2009 [cit. 2010-01-31]. Dostupný z WWW:
<<http://www.wineofczechrepublic.cz/4-1-rozdeleni-vin-cz.html>>.
- [11] JOSEF, Balík . *Vinařství : návody pro laboratorní cvičení*. 3. nezměněné vyd. Brno : Ediční středisko MZLU, 2004. ISBN 8071579335. s. 25,26,37,39.
- [12] PATROCINIO , Garijo, et al. The occurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of a Spanish winery during vintage. *Elsevier : international journal of Food Microbiology*. 2008, 125, s. 141-145.

- [13] PÁTEK, Jaroslav . *Nová vinařská abeceda* . Brno : Blok, 1995. s. 29.
- [14] LONVAUD-FUNEL, Aline. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1999, no. 76, s. 317-331.
- [15] BARTOWSKY, E.J. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology*. 2008, received 1406, s. 1444.
- [16] SALMINEN, Seppo, WRIGHT, Atte von , OUWEHAND, Arthur . *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 3rd rev. edition. [s.l.] : CRC Press, 2004. 633 s. Illustrated. ISBN 0824753321.
- [17] GORNER, Fridrich, VALÍK, Lubomír. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1. vydanie. Bratislava : Malé centrum, 2004. s. 129-131.
- [18] KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Houdek Lubomír, Dernerová Soňa. Praha : Galén, 2005. ISBN 80-7262-341-9. s. 62.
- [19] FUGELSANG, K. C., EDWARDS, Charles G. *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. 2nd edition. [s.l.] : Springer, 2007. 393 s. Illustrated. ISBN 038733341.
- [20] KONINGS, Wilhelmus Nicolaas, et al. *Lactic Acid Bacteria : Genetics, Metabolism, and Applications*. [s.l.] : Springer, 1999. ISBN 0792359534. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine, s. 317-335.
- [21] FARKAŠ, Ján, et al. *Technology and Biochemistry of Wine*. Vol. 2. [s.l.] : AMACOM Div American Mgmt Assn, 1988. Illustrated. ISBN 2881240690. s. 397-398.
- [22] PAVLOUŠEK, Pavel. *Výroba vína u malovinařů*. Praha : Grada Publishing a.s., 2006. ISBN 80-247-1247-4. s. 53-54.69
- [23] HRABĚ, Jan, BUŇKA , František, IGNÁC, Hoza. *Technologie výroby potravin rostlinného původu pro kombinované studium*. 1. vyd. Zlín : Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007. 188 s. ISBN 978-80-7318-520-6.
- [24] PÁTEK, Jaroslav. *Zrození vína : všechno o pěstování, zpracování a konzumaci vína*. 1. vyání. Brno : Books, s. r. o., 1998. ISBN 8072420399. Nemoci vína , s. 75-77.

- [25] LANDETE, J.M., FERRER, S., PARDO, I. Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine?. *Journal of Applied Microbiology* . 2005, no. 99, s. 580-586.
- [26] PRAMATEFTAKI, P.V., et al. Evolution of malolactic bacteria and biogenic amines. *Letters in Applied Microbiology*. 2006, 34, s. 155.
- [27] GARAI, G., et al. Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. *Letters in Applied Microbiology*. 2007, 45, s. 473.
- [28] MORENO-ARRIBAS, M. Victoria, et al. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International journal of Food Microbiology*. 2003, 84, s. 117-118
- [29] LANDETE, José M., et al. Biogenic Amines in Wines from Three Spanish Regions. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005, 53, s. 1119.
- [30] MANGANI, Silvia, et al. Putrescine Accumulation in Wine: Role of *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology : An International Journal*. 2005, no. 51, s. 6-10.
- [31] LANDETE, José María, PARDO, Isabel, FERRER, Sergi. Tyramine and phenylethylamine production among lactic. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, no. 115, s. 364.
- [32] KLABAN, Vladimír. *Svět mikrobů : Malý mikrobiologický slovník*. Hradec Králové : Gaudeamus, 1999. 303 s. ISBN 80-7041-639-4.
- [33] HUTKINS, Robert Wayne. *Microbiology and technology of fermented foods*. [s.l.] : Blackwell Publishing, 2006. 473 s. Illustrated. ISBN 0813800188.
- [34] JACOBSON, Jean L. *Introduction to Wine Laboratory Practices and Procedures*. [s.l.] : Birkhäuser, 2005. Illustrated. ISBN 0387243771. s. 193.
- [35] KANIG, Helmut, et al. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. 1st illustrated edition. [s.l.] : Springer, 2009. 522 s. ISBN 3540854622.
- [36] EUZÉBY, J.P.. *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature : Formerly List of Bacterial names with Standing in Nomenclature (LBSN)* [online]. 28.1.1998 , 13.1.2010 [cit. 2010-02-02]. Anglický. Dostupný z WWW: <<http://www.bacterio.cict.fr/index.html>>.

- [37] MARTIN, Dworkin, STANLEY, Falkow. *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. 3rd rev. edition. Vol. 4. Spolupracovník Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, Erko Stackebrandt. [s.l.] : Springer, 2006. ISBN 0387254943. s. 340-350.
- [38] BARTOWSKY, Eveline J., HENSCHKE, Paul A. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, 125, s. 60-61.
- [39] LOUREIRO, V., MALFEITO-FERREIRA, M. Spoilage yeasts in the wine industry. *International journal of Food Microbiology* . 2003, 86, s. 23-50.
- [40] FLEET, Graham H. *Wine Microbiology and Biotechnology*. [s.l.] : CRC Press, c1993. 510 s. ISBN 0415278503.
- [41] HOCKING, Ailsa D., et al. Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. *International journal of Food Microbiology*. 2007, 119, s. 84.
- [42] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. Masarykova univerzita Brno, 2007 s. 250.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

°ČNM Československý normalizovaný moštoměr

°Kl Klosterneubersky moštoměr

ASVK Aktivované sušené vinařské kvasinky

BMK Bakterie mléčného kvašení

DNA Deoxyribonukleová kyselina

JMK Jablečno-mléčné kvašení

BOK Bakterie octového kvašení

OA Ochratoxin A

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Souhrn bakteriálních pochodů snižujících aroma a chuť vína. [15]</i>	20
<i>Obr. 2. Prstenec bakteriální biomasy na krku lahve na rozhraní vína a prázdného místa se vzduchem. [38]</i>	39

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Rozdělení tichých vín podle obsahu zbytkového cukru. [10]</i>	15
<i>Tab. 2. Rozdělení šumivých vín podle obsahu zbytkového cukru. [10].....</i>	16
<i>Tab. 3. Růst kvasinek během přírodního kvašení. [6].....</i>	42