

# **Vliv řízené fermentace na výskyt bakterií ve vybraných vínech**

Bc. Simona Lišková

---

Diplomová práce  
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie a mikrobiologie potravin  
akademický rok: 2011/2012

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Simona LIŠKOVÁ**  
Osobní číslo: **T10411**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Vliv řízené fermentace na výskyt bakterií ve vybraných vínech**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Stručně charakterizovat výrobu vína.
2. Popsat mikroorganismy vyskytující se ve víně.

### II. Praktická část

1. Provést mikrobiologickou analýzu vybraných vzorků vín.
2. Zpracovat a vyhodnotit získané výsledky.
3. Na základě získaných výsledků vyslovit závěry.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] JACKSON, Ron S. Wine Science. third edition. London : Elsevier, 2008. 751 s. ISBN 978-0-12-3736-16-8.

[2] Robinson, Richard K. Encyclopedia of Food Microbiology, Volumes 1-3. (pp: 2306,2307-2310). Elsevier,2000. ISBN.9780122270703

[3] SEDLÁČEK, Ivo. Taxonomie prokaryot. Masarykova univerzita Brno, 2007 s. 250.

Vedoucí diplomové práce:

**doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

**1. února 2012**

Termín odevzdání diplomové práce:

**2. května 2012**

Ve Zlíně dne 10. února 2012

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



  
doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: Simona Lišková

Obor: THEVP

## 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 <sup>1)</sup>;
- 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> 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 <sup>3)</sup> 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 25.4.2012

Simona Lišková

<sup>1)</sup> 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.

*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.*

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

<sup>2)</sup> *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).*

<sup>3)</sup> *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 jím 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.*

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce se zabývá výskytem mikroorganismů ve víně, které se uplatňují v technologii výroby vín, nebo které mohou mít negativní dopady na výsledný produkt. Největší část práce byla věnována bakteriím mléčného kvašení. V práci je stručně charakterizováno jablečno-mléčné kvašení a jeho důsledky, tvorba a význam biogenních aminů ve víně. Cílem praktické části bylo monitorovat množství mikroorganismů přítomných ve vzorcích červeného vína. Na stanovení počtu životaschopných bakterií byla použita metoda počítání vyrostlých makroskopických kolonií na agarových plotnách. Dále byla provedena charakterizace vybraných kmenů bakterií a byla sledována produkce biogenních aminů.

Klíčová slova: víno, mikroorganismy, bakterie mléčného kvašení, jablečno-mléčné kvašení, biogenní aminy

## **ABSTRACT**

Topic of the thesis is aimed on presence of microorganisms in wine with applications in wine production technology or on microorganisms which can have negative influence on the final product. The main part of the thesis is focused on lactic acid bacteria. Malolactic fermentation and its consequences are briefly characterised in this work as well as formation and importance of biogenic amines in wine. The aim of practical part was to monitor number of microorganisms present in red wine samples. To determine the number of viable bacteria, method of counting macroscopic colonies on agar plate was used. Characterisation of chosen bacterial strains was also done as well as monitoring of biogenic amines production.

Keywords: wine, microorganisms, lactic fermentation bacteria, malolactic fermentation bacteria, biogenic amines

Poděkování:

Především bych chtěla poděkovat vedoucí práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D za trpělivost, laskavost, cenné a odborné rady, které mi usnadnily vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Haně Miklíkové, Ing. Olze Vlčkové a Bc. Adrianě Válkové za rady a pomoc v laboratořích.

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

A handwritten signature in blue ink that reads "Simona Lisikova". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

**Podpis**

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 VÝROBA VÍNA</b> .....	<b>12</b>
1.1 SKLIZEŇ HROZNŮ .....	12
1.1.1 Složení hroznů.....	12
1.1.2 Vady hroznů .....	13
1.2 VÝROBA MOŠTU .....	14
1.2.1 Úpravy moštu .....	14
1.2.2 Bílá a červená vína - příprava moštu.....	15
1.3 KVAŠENÍ VÍNA.....	16
1.4 STÁČENÍ A LAHVOVÁNÍ VÍNA.....	16
1.5 HLAVNÍ CHUŤOVÉ SLOŽKY VÍNA.....	17
1.5.1 Kyseliny.....	17
1.5.2 Cukry.....	18
1.5.3 Alkohol.....	18
1.5.4 Ostatní složky.....	18
<b>2 MIKROBIOLOGIE MOŠTŮ A VÍNA</b> .....	<b>19</b>
2.1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	19
2.1.1 Rozvoj bakterií mléčného kvašení ve víně.....	23
2.1.2 Jablečno-mléčné kvašení.....	23
2.1.2.1 Důsledek jablečno-mléčného kvašení.....	24
2.1.2.2 Podmínky pro jablečno-mléčné kvašení .....	26
2.1.3 Tvorba biogenních aminů.....	27
2.1.3.1 Metody stanovení biogenních aminů ve víně .....	28
2.2 VÝZNAMNÉ BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ VYSKYTUJÍCÍ SE VE VÍNĚ .....	29
2.2.1 <i>Lactobacillus</i> .....	29
2.2.2 <i>Leuconostoc</i> .....	30
2.2.3 <i>Oenococcus</i> .....	30
2.2.4 <i>Pediococcus</i> .....	31
2.2.5 <i>Weissella</i> .....	31
2.3 BAKTERIE OCTOVÉHO KVAŠENÍ .....	32
2.4 KVASINKY .....	32
2.4.1 <i>Dekkera</i> .....	34
2.4.2 <i>Hanseniaspora</i> .....	34
2.4.3 <i>Pichia</i> .....	34
2.5 PLÍSNĚ.....	34
<b>3 CHOROBY A VADY VÍNA ZPŮSOBENÉ MIKROORGANIZMY</b> .....	<b>36</b>



3.1	MYŠINA.....	36
3.2	KŘÍS .....	36
3.3	VLÁČKOVATĚNÍ VÍN .....	37
3.4	VADY VÍNA ZPŮSOBENÉ NESPRÁVNOU FERMENTACÍ.....	37
3.5	DALŠÍ VADY VÍNA .....	38
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>41</b>
5.1	ANALYZOVANÝ MATERIÁL .....	41
5.2	POUŽITÝ MATERIÁL .....	45
5.3	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	45
5.4	ŽIVNÁ MÉDIA.....	46
<b>6</b>	<b>POUŽITÉ METODY .....</b>	<b>48</b>
6.1	STATICKÁ KVANTITATIVNÍ KULTIVACE .....	48
6.2	IZOLACE A UCHOVÁVÁNÍ MIKROORGANIZMŮ .....	48
6.3	METODY POUŽITÉ PRO CHARAKTERIZACI BAKTERIÍ .....	49
6.4	ZJIŠŤOVÁNÍ PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ V DEKARBOXYLAČNÍM MÉDIU .....	49
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>51</b>
7.1	POČTY VYROSTLÝCH KOLONIÍ .....	51
7.2	CHARAKTERIZACE IZOLOVANÝCH BAKTERIÍ.....	61
7.3	ZJIŠŤOVÁNÍ PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ V DEKARBOXYLAČNÍM MÉDIU .....	75
<b>8</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>90</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>92</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>99</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>100</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>101</b>

## ÚVOD

Víno je alkoholický nápoj vzniklý ze zkvašených hroznů. Pozornost v případě vína si zasluhují vyskytující se mikroorganismy a produkty jejich metabolismu, které mají vliv na technologii výroby vína a mohou působit i problémy. Mikroflóra se během celého procesu výroby obměňuje a jednotlivé mikroorganismy se vzájemně ovlivňují. Primární alkoholové kvašení bývá vyvoláváno především působením kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Často je také podporováno sekundární kvašení, tzv. jablečno-mléčné kvašení, za které jsou zodpovědné bakterie mléčného kvašení. Oba procesy mají vliv na výslednou stabilitu a kvalitu vína. To, jak mikroflóra ovlivňuje vlastnosti vína, závisí na množství přítomných mikroorganismů a na jejich druhu. Popis mikroorganismů a jejich přínos nebo potíže s nimi spjaté jsou náplní práce.

V praktické části byl proveden mikrobiologický rozbor vzorků červených vín. Bylo sledováno množství vybraných skupin bakterií, morfologické a mikroskopické znaky. V poslední kapitole byla sledována produkce biogenních aminů u vybraných kmenů bakterií.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 VÝROBA VÍNA

Výroba vína je staletí stará biotechnologie, která je součástí celosvětového podnikání a významně ovlivňuje ekonomiku mnoha zemí. [1] Výroba vína začíná sklizní hroznů. V našich klimatických podmínkách hrozny révy vinné dozrávají koncem srpna, v září a začátkem října, kdy se sklízí. Výjimkou jsou pozdní a ledové sběry. [2] Základní operace při procesu výroby vína se skládají ze zisku hroznové šťávy (moštu) drcením ovoce a alkoholovým kvašením pomocí kvasinek (endogenních, exogenních kultur), zrání, čiření a balení. [1] Bílá vína se vyrábějí ze žlutých, růžových a červených odrůd, červená vína z modrých odrůd. Většina kroků výroby je u obou vín obdobná. [3] Hlavní kroky výroby bílého vína jsou sklizeň hroznů, odzrňování, drcení a naležení drtě, lisování a následné odkalení moštu a jeho úprava. Dále následuje kvašení, stáčení, školení a stabilizace. Jako poslední je lahvování a skladování. U červených vín se hlavní kroky skládají ze sklizně hroznů, odzrňování a drcení, nakvácení, lisování, dokvácení, biologické odbourávání kyselin, stáčení a školení vína. [4]

### 1.1 Sklizeň hroznů

Období sklizně hroznů se nazývá vinobraní. Hrozny se sklízí v plné zralosti, neboť vína, která jsou vyrobena z předčasně sklizených hroznů, jsou velmi často kyselá s drsnou a neharmonickou chutí. [2] Při výrobě vína je hlavním cílem sklídit hrozny po všech stránkách kvalitní a ve vynikajícím stavu. Neměly by být napadeny houbovými chorobami či poškozeny ptactvem, nebo hmyzem. V průběhu sklizně hrozí poškození a rozmačkání hroznů a to jak při samotném sběru, tak při přepravě, tím pádem se mošt uvolní dříve, nežli dojde k vlastnímu zpracování hroznů. U takových hroznů může dojít k nežádoucímu oxidativnímu hnědnutí. Mošt z poškozených hroznů může být napaden kvasinkami nebo bakteriemi. Pokud sklizeň hroznů proběhne v teplých částech dne, velmi často to způsobí akceleraci činnosti kvasinek a bakterií a tím i tvorbu nežádoucích látek v hroznech a následně vznik vad a chorob vína. [5]

#### 1.1.1 Složení hroznů

Hrozny jsou nejdůležitější surovinou pro výrobu vína. Dobrá znalost jejich složení je nezbytná pro pochopení procesu výroby vína a vede k tvorbě kvalitního vína. Hrozny révy vinné jsou složeny z třapin a bobule. Bobule je složena ze slupky, dužiny a semen. Hrozny

jsou složeny zejména z vody a v menším množství z organických a anorganických sloučenin. Pro výrobu vína jsou nejdůležitější cukry, organické kyseliny, fenolické sloučeniny, dusíkaté sloučeniny, aromatické složky, minerály a pektinové látky. V hroznech jsou hlavními cukry glukóza a fruktóza. Obsah cukrů ve šťávě ze zralých hroznů se pohybuje mezi 150 – 250 g/l. V nezralých plodech převládá glukóza, ve zralých plodech jsou obvykle glukóza i fruktóza ve stejném poměru, a v přezrálých plodech fruktóza převyšuje glukózu. Tyto cukry jsou zkvasitelné a v průběhu kvašení jsou převáděny na alkohol, oxid uhličitý a případně i na další látky. Množství vyrobeného alkoholu tedy souvisí s množstvím původně přítomných cukrů. Po cukrech jsou nejvíce zastoupeny organické kyseliny, které mají podstatný vliv na stabilitu vína, barvu, pH. Fenolické sloučeniny, jakožto další významná součást bobulí, jsou přítomny v různém množství. Hrají důležitou roli v udávání barvy a chuti vína a také při stárnutí a zrání vína. Jsou umístěny zejména v semenech a kůži bobulí. Mezi hlavní zástupce této skupiny patří antokyany a třísloviny. Hrozny obsahují také různé dusíkaté sloučeniny, patří mezi ně amonné kationty, dusíkaté látky, aminokyseliny, peptidy, proteiny. U jednotlivých odrůd se obsah dusíkatých látek liší, obecně se jeho koncentrace zvyšuje během zrání. Dusíkaté sloučeniny jsou významné, protože slouží jako zdroj živin pro kvasinky a bakterie mléčného kvašení (BMK). Minerální látky tvoří přibližně 0,2-0,6% z čerstvé hmotnosti plodu. Důležitými zástupci jsou draslík, sodík, železo, fosfáty, sulfáty a chloridy. V buněčné stěně jsou obsaženy pektinové látky, které mohou za určitých podmínek způsobovat zákaly ve víně, proto se často k jejich eliminaci používají pektolytické enzymy. [6]

### 1.1.2 Vady hroznů

Perenospora (*Plasmopara viticola*) je jednou z nejzávažnějších chorob révy vinné. Napadá hrozny i všechny zelené části rostliny, napadená místa zasychají. Tato choroba se rozvíjí zejména při střídání deště a přímého slunečního svitu. Ochranou je aplikace fungicidů v průběhu vegetace. [7]

Při padlí révy vinné (*Uncinula necator*) bývají hrozny napadeny od odkvětu až do období zralosti. Projevuje se bílými povlaky a následným usycháním napadených orgánů. U bobulí rozrušuje slupku, způsobuje její popraskání a ztrátu šťávy. Jedná se o chorobu houbové povahy a jako ochrana se používají postřiky fungicidními sirnými přípravky. [7]

Plíseň šedá (*Botrytis cinerea*) je houbová choroba, která způsobuje nejčastější hnilobu bobulí a snižuje výnosnost. Dochází k praskání slupek a tím k výparu vody z dužiny. Díky tomuto výparu se obsah dužiny zakoncentrovává a zvyšuje se množství cukrů. Tyto hrozny mohou být využity pro speciální účely, jako je například výroba tokajských vín. Tato hniloba se může někdy označovat i jako tzv. ušlechtilá plíseň. [7]

Mezi další vady lze zařadit např. zapažené hrozny, které mají nepříjemnou chuť, která přechází do vína. Vzhledem k tomu se nesmí pro jeho výrobu využívat. Hrozny se musí ihned po sklizni drtit a zpracovávat. Nerozdrcené hrozny ve vysoké vrstvě se při delším skladování zahřívají, probíhá zde dýchání čímž, dochází k zapažení. [7]

## 1.2 Výroba moštu

K získání kvalitního moštu s požadovanou jakostí se hrozny zpracovávají různými operacemi, mezi které patří drcení, odzrňování, scezování a lisování. [2] Sklizené hrozny se dopraví do zpracovatelských závodů, kde se stanovuje jejich průměrná cukernatost. [3] V lisovně dochází k odzrňení a to na různých typech odzrňovačů, v nichž se zachycují třapiny, a rmut protéká do sběrné nádrže. [2] Zejména u zpracování modrých odrůd je potřebné surovinu odzrňit za účelem zabránění extrakce nežádoucích složek, jako jsou třísloviny a chlorofyl, které mají negativní vliv na sensorickou skladbu budoucího nápoje. [8] Rmut se dopravuje do scezovacích nádob a po scezení se důkladně vylisuje, aby se získalo co nejvíce moštu. [5] Abychom získali kvalitní mošt, zaručující hladký průběh kvašení a vysokou jakost vyrobeného vína, je třeba mošt získaný lisováním dodatečně upravovat. [3]

### 1.2.1 Úpravy moštu

Úpravy moštu se provádí odkalováním, provzdušňováním, sířením, odkyselováním a úpravou cukernatosti. [3] Mošt získaný lisováním je kalný, zůstávají v něm nepatrné úlomky slupek a dužiny, stejně tak se do něj dostávají nežádoucí mikroorganismy a to z nahnilých či chorobami postižených hroznů. Musí se tedy odkalovat. [4] Odkalování může probíhat několika způsoby. Na odstředivkách probíhá mechanické odkalování nebo se mošt filtruje přes vakuový filtr či flotací. [8]

Účelem provzdušňování moštů je obohatit je o vzdušný kyslík. Prosycení moštu kyslíkem podporuje množení kvasinek a sedimentaci bílkovinných látek, pektinů a tříslovin. Mošty pocházející z vadných a zvláště nahnilých hroznů se nedoporučuje provzdušňovat. Mohly

by snadno podlehnout činnosti oxidačních enzymů, které by vyvolaly jejich zhnědnutí. Navíc hrozí i rozšíření aerobních mikrobů, které vyvolávají octové kvašení a neenzymové oxidační procesy. Vzhledem k tomu se provzdušňují pouze mošty z úplně zdravých a nepoškozených moštů. K provzdušnění obvykle stačí, teče-li mošt z lisu do kádě či do sběrné nádrže, odkud se čerpá do kvasných nádob. [9]

Síření má ve vinařství značný význam. Síra působí ve víně jako stabilizační a konzervační prostředek. Při běžném množství obsaženém ve víně je síra zdravotně nezávadná, ale při velkých koncentracích může způsobovat například bolesti hlavy. Oxid siřičitý ve vínech potlačuje činnost mikroorganismů, více a významněji působí na rozvoj bakterií než kvasinek. Dále zabraňuje oxidaci vyvázáním kyslíku, lze jej považovat za antioxidant. Aplikace oxidu siřičitého tlumí činnost některých negativně působících enzymů. Zároveň podporuje tvorbu glycerolu při kvašení. Zdravé mošty se síří na koncentraci 20-40 mg/l SO<sub>2</sub>. Tuto koncentraci je možno zvýšit u moštů z nahnilých hroznů. U červených vín dochází po zasíření k mírnému odbarvení antokyanových barviv, ale zabrání se tím pozdější oxidaci, takže vína mají pak intenzivnější červenou barvu. [5, 7]

Během zrání révových bobulí dochází ke snižování obsahu kyselin. V hroznech se vyskytuje zejména kyselina jablečná a vinná. Obsah kyselin se pohybuje od 0,6 – 0,8 %. Průměrný obsah kyselin přispívá k harmoničnosti vína a do určité míry jej konzervuje. Odkyselení je založeno na tvorbě nerozpustného vinanu vápenatého. [7]

K zjišťování cukernatosti se používají různé druhy moštoměrů. U nás je uzákoněn Český normalizovaný moštoměr (°NM), užívá se i Klosterneubursky moštoměr (°KMW). [10] Docukřovat se smí pouze cukrem, který je za studena rozpuštěn v přiměřeném obsahu moštu a má proběhnout do 72 hodin po vylisování. Při pozdějším docukření nakvašeného moštu se zvyšuje doba kvašení a víno se pomaleji čistí. U červených vín se cukr může přidávat před nakvašováním rmutu. Každým přidaným kilogramem cukru se objem moštu zvyšuje o cca 0,66 l. Docukřování je zakázáno u révových vín s přívlastkem. Docukření zvyšuje obsah etanolu v konečné fázi. [7]

### 1.2.2 Bílá a červená vína - příprava moštu

Pro výrobu bílého vína se hrozny lisují ihned nebo maximálně do 24 hodin. Vylisovaný mošt se odkalí a kvasný proces neprobíhá na slupkách. U červených vín se rmut nechává nakvasit na matolinách za teploty 15 °C maximálně 8 dní. Vzniká CO<sub>2</sub>, který na povrch

může vynášet nečistoty, které tvoří pevnou vrstvu, tzv. matolinový klobouk. Tento klobouk je třeba neustále rozbíjet. [11]

### 1.3 Kvašení vína

Alkoholové kvašení je biochemický proces rozkladu cukru obsaženého v moštu na alkohol (etanol) a CO<sub>2</sub> způsobený kvasinkami. Začátek kvašení je charakterizován pozvolným rozmnožováním kvasinek a začátkem prokvašování cukrů moštů. Trvá 2 - 3 dny. Následuje bouřlivé kvašení projevující se vývinem tepla, zvýšením teploty nad 25 °C a uvolňováním oxidu uhličitého, nastává třetí až čtvrtý den. Tato fáze trvá několik dnů až týdnů a je třeba během ní regulovat teplotu v rozmezí 15 - 18 °C. Poslední fází je dokvašování, dochází k němu při poklesu obsahu cukru na 2 - 5g/l a jeho délka je 1 - 2 měsíce, někdy i půl roku. Činnost kvasinek postupně klesá, až ustane. Následně kvasinky začínají sedimentovat na dno tanku, kde se usazují také kaly. Po prokvašení moštu získáme mladé víno, které se musí zbavit nečistot usazených na dně nádob (zbytků slupek, dužiny, mrtvých kvasinek aj). Mladé víno se nechá v klidu, aby se samo vyčistilo, potom se kvasnicový kal odstraňuje stáčením vína. Během stáčení je třeba postupovat tak, aby nevzniklo nebezpečí kontaminace nežádoucími mikroorganismy. [10]

Révoový mošt má optimální množství chemických sloučenin nutných pro životní pochody kvasinek, takže není nutná zvláštní úprava (přídavek živin). Během fermentace souběžně s tvorbou alkoholu vznikají i vedlejší produkty, jako jsou glycerol, kyselina mléčná, vinná, octová a vyšší alkoholy. Metanol vzniká ve víně rozkladem pektinů, jeho množství je však zanedbatelné. U červených vín je jeho množství vyšší než u bílých. Pro dosažení optimálního průběhu kvašení se v poslední době uplatňují zákvasy, což jsou koncentráty čistých kulturních kvasinek, které mohou být aplikovány ve formě suspenze nebo v suché aktivní formě. Cílem použití těchto koncentrátů je dosažení urychleného a hlubokého prokvašení, potlačení cizí technologicky nežádoucí mikroflóry, např. divokých kvasinek, hnilobné mikroflóry a tím nižší tvorby nežádoucích látek. [7]

### 1.4 Stáčení a lahvování vína

Během stáčení vína dochází k převodu obsahu z jedné nádoby do druhé před podáváním. Pomalé a opatrné stáčení, zejména u staršího vína, umožňuje oddělení usazenin, které mohou vínu dodávat nežádoucí hořkou chuť. Při přelévání vína dochází ke styku s kyslíkem,



což umožňuje zejména u mladých vín rozvíjet chuť. Stáčení mladého vína bez sedimentu je jednoduché. Při stáčení starších vín se sedimentem je třeba větší šikovnost. A to hlavně aby nedocházelo k velkému kontaktu s kyslíkem. [12]

Posledním krokem při výrobě vína je lahvování, během kterého mohou být vína mikrobiologicky kontaminována. Je potřebné, aby všechny kroky výroby vedly k vytvoření a udržení mikrobiologicky stabilního produktu. Při nedostatečně opatrnosti stáčení téměř vždy povede k mikrobiologicky nestabilnímu hotovému vínu. Živé mikroorganismy mohou být i po stáčení metabolicky aktivní. K těmto aktivitám patří sekundární kvašení (produkce oxidu uhličitého), tvorba nepříjemného aroma a chuti (kyselina octová, 4-etyl-fenol), tvorba usazenin, viskózních látek a změna barvy. Stáčení vína je složitý proces, a proto byly pro ochranu před mikrobiální nestabilitou vína zavedeny systémy pro zajišťování kvality, kontrolu kvality a program správné výrobní praxe. Mezi možné zdroje mikrobiálních problémů v průběhu celého stáčení patří kontaminace mikroorganismy z okolí, znečištěná voda nebo rozvody vody, uzavírací tanky při nedostatečné sanitaci, nerovnosti svárů, hrubá plocha nebo nedostatek běžné hygieny. Komplexní plán pro zabránění kontaminace zahrnuje léčbu nestabilního vína konzervačními prostředky, sterilizací nebo filtrací, použití oxidu siřičitého. [13]

## 1.5 Hlavní chuťové složky vína

### 1.5.1 Kyseliny

Z počátku zrání hrozny obsahují pouze kyseliny a žádný cukr. V průběhu zrání kyselost klesá a stoupá množství cukrů. V teplejších oblastech se kyselost snižuje rychleji. Hlavní kyselinou ve víně je kyselina vinná. Ta během kvašení není zpracovávána kvasinkami. V důsledku obsahu alkoholu ve víně, který pozměňuje její rozpustnost, se může 0,5 – 1,5 g/l kyseliny vinné vysrážet jako vinný kámen. Další obsaženou kyselinou je kyselina jablečná, ta je lehce zpracovávána mikroorganismy. Během kvašení ji kvasinky přeměňují a vzniká alkohol. [14, 15] Přítomnost karboxylových kyselin ve víně je nezbytná pro sensorické vlastnosti vína. Kyseliny tvoří svěží chuť, ovlivňují stabilitu barvy vína a mění vnímání jiných chuťových látek. Musí být však přítomny v přiměřeném množství. [16]

### 1.5.2 Cukry

Sladkost vína se projevuje primárně díky přítomnosti cukrů a to zejména glukózy a fruktózy. Vnímatelnou sladkost vytváří při koncentracích nad 0,2 %. Většina stolních vín má obsah zbytkového cukru menší a označují se jako suchá vína. Sladkost u suchých vín ovlivňuje přítomnost aromatických sloučenin v kombinaci s mírnou sladkou chutí etanolu a glycerolu. [16]

### 1.5.3 Alkohol

Ve víně se vyskytuje několik alkoholů, ale pouze etanol se vyskytuje v dostatečném množství, aby produkoval nějaký chuťový vjem. Přestože má sladkou chuť, kyseliny vína snižují jeho smyslové vnímání, naopak cukrům pomáhá vyniknout. Etanol rozšiřuje vnímanou intenzitu hořkých fenolických látek a zároveň snižuje trpkost vyvolanou tříslovinami. Dále se ve víně vyskytuje několik cukerných alkoholů jako alditol, arabitol, manitol a myoinositol. [16]

### 1.5.4 Ostatní složky

Aromatické sloučeniny se nacházejí většinou v buňkách slupek hroznů a jsou přímo zodpovědné za primární aroma, které má různý charakter v závislosti na odrůdě révy vinné. [15] Množství glycerolu ve víně závisí na zralosti hroznů a druhu kvasinek použitých během kvašení. Vyznačuje se mírně sladkou chutí. [15, 16]

## 2 MIKROBIOLOGIE MOŠTŮ A VÍNA

Mikroorganismy nacházející se ve víně se popisují jako endogenní (z hroznů nebo z vinařských ploch) a exogenní (z vybraných startovacích kultur). V hroznech se základní mikroflóra skládá zejména z kvasinek (*Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*). Součástí mikroflóry hroznů, moštu a vína jsou také bakterie, zejména bakterie mléčného kvašení a octového kvašení (*Gluconobacter*, *Acetobacter*). Z technologického hlediska se rozdělují na užitečné, které víno zlepšují, protože jejich účinkem probíhá ve víně jablečno-mléčná fermentace, a škodlivé, vlivem kterých ve víně vznikají nežádoucí mikrobiologické změny. Z plísní se vyskytují nejčastěji následující druhy: *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Ucinula*, *Cladosporium*. [1, 17]

Zdrojem mikroorganismů jsou jak hrozny, tak i vinařské zařízení. Hrozny z vinic osidluje populace mikrobů, z nichž dochází k množení některých kvasinek, bakterií a plísní. [18] Nejvíce mikroorganismů se do moštů dostává z půdy, jejich největší koncentrace bývá v období, kdy hrozny zaměkají a při jejich sklizni. Z velké části však mohou být v průběhu vinobraní smyty deštěm. [10] Taktéž vinařské vybavení bývá zdrojem mikroorganismů. [18] Vliv na životní podmínky různých mikroorganismů ve víně mají teplota, množství alkoholu, oxidačně-redukční prostředí a také stupeň kyselosti vína. Pro existenci různých druhů mikroorganismů jsou úrovně těchto faktorů odlišné. [10]

Výroba vína je proces, ve kterém dochází k sérii kompletních mikrobiologických přeměn, uskutečňovaných kvasinkami, bakteriemi i plísněmi a jejich interakcemi. Výsledné organoleptické vlastnosti vína ovlivňuje odrůda a metabolická aktivita kvasinek a bakterií. [1]

### 2.1 Bakterie mléčného kvašení

Mléčné kvašení je bakteriální proces, který zaujímá významné místo během produkce mnoha potravinářských výrobků. Poskytuje finální produkty s charakteristickým aroma a texturou a hraje významnou roli v technologii. Za mléčné kvašení jsou zodpovědné bakterie mléčného kvašení (BMK), které představují skupinu grampozitivních bakterií spojených morfologickými, metabolickými a fyziologickými vlastnostmi. BMK tvoří heterogenní skupinu bakterií zahrnující kulaté nebo tyčinkovité, kataláza negativní, nepohyblivé, nesporulující, anaerobní a aerotolerantní bakterie produkující kyselinu mléčnou jako hlavní metabolit vznikající při kvašení cukrů. [19, 20]

BMK tvoří širokou skupinu s velkou rozmanitostí skládající se z 6 čeledí (Tab. 1). *Aerococcaceae* se sedmi rody, *Carnobacteriaceae* (16 rodů), *Enterococcaceae* (7 rodů), *Lactobacillaceae* (3 rody), *Leuconostocaceae* (4 rody) a *Streptococcaceae* (3 rody). [21] Mezi potravinářsky významné zástupce BMK se řadí rody: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella*. Z dalších rodů BMK lze zmínit např. *Abiotrophia*, *Agitococcus*, *Alcalibacterium*, *Alloicoccus*, *Atopobacter*, *Atopococcus*, *Desemzia*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Globicatella*, *Lactosphaera*, *Lactovum*, *Melissococcus*, *Paralactobacillus*. [20, 22] BMK ve svém fermentativním metabolismu vytváří podmínky a produkují látky, které na jiné, většinou nežádoucí bakterie působí inhibičně. Dalším z jejich selekčních faktorů je rychlé snížení pH prostředí na hodnoty kolem pH 4, které lze využít k prodloužení trvanlivosti potravin. Pro rozvoj BMK je nutné prostředí s mnoha živinami a růstovými faktory, protože neumí syntetizovat některé aminokyseliny a vitaminy skupiny B. [10]

Při výrobě vína mohou bakterie mléčného kvašení zvyšovat i snižovat kvalitu vína. Jsou zodpovědné za jablečno-mléčné (malolaktické) kvašení, ale mohou také způsobovat změny, které nepříznivě ovlivňují smyslové vlastnosti finálního výrobku. [19]. Většina izolovaných bakterií mléčného kvašení má schopnost odbourávat kyselinu jablečnou, část jich je schopná odbourávat i kyselinu citronovou. Naopak převážná většina kmenů nedegraduje tartarát. [8, 10]

Homofermentativní mléčné bakterie (*Lactococcus* sp. a *Pediococcus* sp.), tvoří z hexózu jen kyselinu mléčnou. [8]

Heterofermentativní mléčné bakterie (*Leuconostoc* sp. a některé *Lactobacillus* sp.) tvoří z hexózu směs kyseliny mléčné, etanolu, CO<sub>2</sub> a v menším množství i některé další kyseliny, zejména kyselinu mravenčí a octovou. [8, 10]

BMK se vyskytují na hroznu, na listech, v půdě, moštu a ve víně. Na bobulích hroznů je bakteriální populace nízká nebo jen málo z nich je schopno růst v laboratorních podmínkách. Větší množství bakterií může být izolováno z drcených hroznů přelitých do kvasných nádob. Jejich populace se pohybuje mezi 10<sup>2</sup> až 10<sup>4</sup> CFU/ml a závisí na klimatických podmínkách během posledních dnů zrání hroznů. Počet ovlivňuje také pH, nejlépe se rozmnožují při pH 3,5 až 4. Také teplota hraje významnou roli při růstu a rozmnožování

BMK. Většina roste i při teplotě 15 °C, optimum je při 25 °C, a jejich činnost se zastavuje při 40-45°C. Obsah SO<sub>2</sub> také ovlivňuje rozvoj bakterií, obsah 50 mg/l SO<sub>2</sub>, bakterie prakticky inhibuje. Nejvyšší počet kmenů a nejvyšší aktivita BMK je během jablečno-mléčného kvašení, které nastává po kvašení nebo někdy už během dokvašování. [9,23] Bakterie mléčného kvašení izolované z hroznového moštu patří k dvěma čeledím reprezentovanými čtyřmi rody: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*. [10]

Tab. 1 Výčet bakterií mléčného kvašení [24]

Čeleď	Rod	Druhy z moštu a vína
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>  <i>Paralactobacillus</i>  <i>Pediococcus</i>	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. diolivorans</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. fructivorans</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>Lb. jensenii</i> , <i>Lb. kunkeei</i> , <i>Lb. mali</i> , <i>Lb. nagelii</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. vini</i>  <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. parvulus</i> , <i>P. damnosus</i>
Aerococcaceae	<i>Aerococcus</i> <i>Abiotrophia</i> <i>Dolosicoccus</i> <i>Eremococcus</i> <i>Facklamia</i> <i>Globicatella</i> <i>Ignavigagranum</i>	
Carnobacteriaceae	<i>Carnobacterium</i> <i>Agitococcus</i> <i>Alkalibacterium</i> <i>Allofustis</i> <i>Alloiococcus</i> <i>Desemzia</i> <i>Dolosigranulum</i> <i>Granulicatella</i> <i>Isobaculum</i> <i>Lactosphaera</i> <i>Marinilactibacillus</i> <i>Trichococcus</i>	
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i> <i>Atopobacter</i> <i>Melissococcus</i> <i>Tetragenococcus</i> <i>Vagococcus</i>	
Leuconostoccaceae	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i>	<i>Lc. mesenteroides</i> <i>O. oeni</i> <i>W. paramesenteroides</i>
Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i> <i>Lactococcus</i>	

### 2.1.1 Rozvoj bakterií mléčného kvašení ve víně

Jak již bylo zmíněno, menší množství mléčných bakterií (méně než 100 CFU/g), se nachází na hroznech, výskyt octových bakterií a kvasinek je vyšší. Bakterie je možné najít na vinných listech, stoncích a stejně tak na vinařském zařízení. [25] V souvislosti s procesem výroby vína bývají zmiňovány tři hlavní rody BMK a to *Oenococcus*, *Pediococcus* a *Lactobacillus*. Kromě kyseliny mléčné mohou tvořit vedlejší metabolity, které utvářejí aroma vína. Nejvhodnějším je *Oenococcus oeni*, který je dobře adaptovaný na podmínky ve víně, zejména na nízké pH a vysokou koncentraci alkoholu. Proto je také hlavním druhem, který uskutečňuje jablečno-mléčné kvašení. [26] Na začátku alkoholového kvašení dominují laktobacily. Po jablečno-mléčném kvašení lze nalézt zejména pediokoky. Vína s pH pod 3,5 obvykle obsahují pouze kmeny *Oenococcus oeni*, zatímco vína s pH nad 3,5 obvykle obsahují různé druhy *Pediococcus* a stejně tak heterofermentativní laktobacily. [25]

Rozvoj BMK během výroby vína je takový, že po rozdrcení hroznů a během prvních dnů alkoholového kvašení obecně dochází ke zvyšování počtu BMK až na maximum  $10^4$  CFU/ml. Hlavními druhy v této fázi jsou *Lactobacillus casei*, *Lb. plantarum* a v menší míře *Oenococcus oeni*, *Pediococcus cerevisiae*. Tyto druhy se zpravidla nemnoží a odumírají v průběhu kvašení, může dojít k jejich snížení až na  $10^2$  CFU/ml na konci alkoholového kvašení. [23, 25] Po alkoholovém kvašení a před začátkem jablečno-mléčného kvašení se víno nesmí sířit pomocí  $\text{SO}_2$ , ten by totiž inhiboval růst BMK. Víno je během této přechodné doby vystaveno chemické oxidaci a je náchylné k mikrobiálnímu kažení, proto by nemělo docházet ke zpoždění mezi těmito fermentacemi. Vzhledem k tomu vinaři využívají startérové kultury, které se zpravidla dodávají v lyofilizované formě. Nejúčinnější jsou kmeny *O. oeni.*, které byly původně izolovány z vína. Startérové kultury *O. oeni* musí být zaočkovány po dokončení alkoholového kvašení. [27] Jakmile počet BMK dosáhne  $10^6$  CFU/ml nastane jablečno-mléčné kvašení. Zahájení toho to kvašení ovlivňuje teplota, pH, obsah etanolu. Tyto faktory rovněž ovlivňují bakteriální růst ve víně. [23]

### 2.1.2 Jablečno-mléčné kvašení

Jablečno-mléčné kvašení (JMK) hraje významnou roli při určování kvality většiny červených vín, ale také u některých bílých vín a klasických šumivých vín. JMK je mikrobiální proces, během kterého některé bakterie mléčného kvašení přeměňují kyselinu L-jablečnou na kyselinu L-mléčnou a  $\text{CO}_2$ . Kromě odkyselení JMK přispívá ke komplexní chuti vína a

podporuje i jeho mikrobiologickou stabilitu. [28] Růst BMK musí být během JMK kontrolován, aby nedocházelo k růstu nežádoucích BMK, které produkují nepříznivé látky. [25] Nekontrolované jablečno-mléčné kvašení může nepříjemně ovlivnit vína a způsobit jejich kažení zejména u vín s vysokým pH, která jsou typická pro teplejší oblasti. Může způsobit změny červené barvy (snížení intenzity až o 30%) a mohou být produkovány biogenní aminy. [29]

Bakterie získávají energii z L-malátu prostřednictvím generování protonového gradientu přes buněčnou membránu. Pouze kmeny *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus* jsou odolné vůči nízkému pH (<3,5), SO<sub>2</sub> (50 mg/l), a obsahu etanolu kolem 10% a mohou přežít. *Pediococcus damnosus*, *Leuconostoc mesenteroides* a *Oenococcus oeni* převládají během alkoholového kvašení, nicméně na jeho konci je spontánní jablečno-mléčné kvašení způsobeno především druhem *O. oeni*. [29]

Jablečno-mléčné kvašení je podporováno v chladných vinařských oblastech, kde mají hrozny vysokou hladinu kyseliny jablečné. Při zrání vína v dubových sudech a při dlouholetém zrání v lahvích je součástí procesu (např. Champagne). [29]

Spontánní JMK je nepředvídatelné, může se objevit kdykoliv během nebo i několik měsíců po ukončení alkoholového kvašení. Zejména při delší fermentaci se může víno nakazit bakteriofágy. Použití startérových kultur k zahájení začátku JMK je často neúspěšné vzhledem k rychlé ztrátě životaschopnosti buněk po naočkování. [29]

### **2.1.2.1 Důsledek jablečno-mléčného kvašení**

Bakterie mléčného kvašení spotřebovávají živiny (aminokyseliny, dusíkaté látky a vitaminy), což vede ke snížení živin pro potenciálně nežádoucí mikroorganismy. Úspěšné jablečno-mléčné kvašení může podpořit růst *O. oeni*, laktobacilů a pediokoků. Růst bakterií může pokračovat i po skončení JMK, zejména pokud zůstává nízká hladina SO<sub>2</sub>. Pokud JMK způsobí zvýšení pH nad 3,5, tak může podpořit růst organismů, které přispívají ke kažení vína. [10]

JMK ovlivňuje konečnou chuť vína. Při JMK mohou BMK produkovat celou řadu produktů (sukcinát, acetát, acetoin, laktát, diacetyl, manitol, 2-butanol, 1,3-propandiol a mnoho dalších), které mohou rozšiřovat aroma vína (např. ořechové, mléčné a zemité). Jejich množství závisí na dostupnosti živin (kyseliny, cukry atd.). Nežádoucí pachové látky, které



vznikají při JMK, jsou spojovány s pediokoky a laktobacily nebo s JMK probíhajícími při pH nad 3,5. [30]

JMK ovlivňuje vzájemně propojené aspekty kvality vína: kyselost, mikrobiální stabilitu, organoleptické vlastnosti a hygienickou kvalitu. Za určitých podmínek může JMK přispět ke zkvalitnění vína, ale také může mít negativní vliv (Tab. 2). [31]

Tab. 2 Vliv metabolismu BMK na smyslový profil vína. [31]

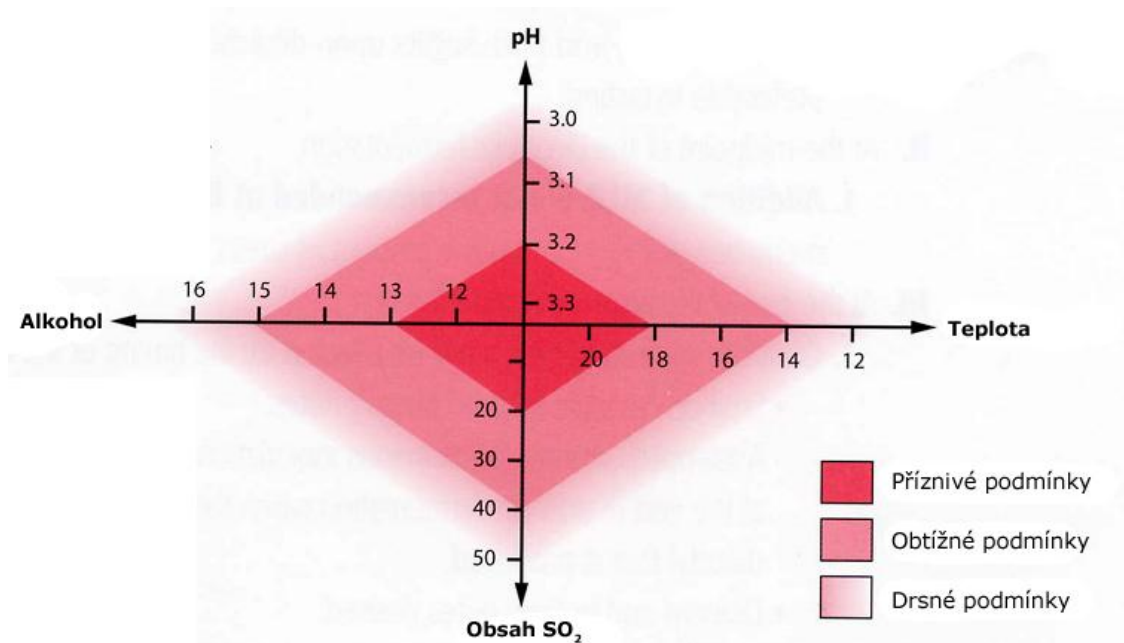
Bakteriální kmen	Výhody	Rizika
Vybrané <i>O. oeni</i>	Snížení celkové kyselosti Snížení keto a aldehydových sloučenin Částečná mikrobiální stabilita Lepší kontrola produkce diacetylu Dominance nad původními bakteriemi	Tvorba těkavých kyselin (zejména při vysokém pH, za přítomnosti zbytkového cukru a po degradaci kyseliny L-jablečné Ztráta barvy Výroba etyl karbonátu
Spontánní <i>O. oeni</i>	Snížení celkové kyselosti Snížení keto a aldehydových sloučenin Částečná mikrobiální stabilita	Dlouhá lag fáze ovlivňující zvýšení obsahu těkavých kyselin Výrazný růst bakterií produkujících diacetyl Změny (kažení) vůně a chuti Snížení množství esterů (ovocných značek) Ztráta odrůdového aroma Ztráta barvy způsobená reakcemi s polyfenoly Tvorba biogenních aminů Výroba etyl karbonátu
<i>L. mesenteroides</i>	Snížení celkové kyselosti	Tvorba viskózních látek Kažení chutě a vůně
<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. casei</i>	Snížení celkového obsahu kyselin v moštu nebo víně Netvoří kyselinu octovou z cukrů (hexóz)	Citlivost na alkohol při více než 5% obj. Zpomaluje, nebo zastavuje kvašení při vysoké koncentraci a při vysokém pH Kazí chuť a vůni ( <i>Lb. casei</i> )
<i>P. pentosaceus</i> <i>P. damnaus</i>	Snížení celkového obsahu kyselin v moštu nebo víně Netvoří kyselinu octovou z cukrů (hexóz)	Tvorba viskózních látek Tvorba biogenních aminů Riziko zpomalení kvašení při pH > 3,5 a vysoké koncentraci Riziko zvyšování hodnot pH
<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. hilgardi</i>	Snížení celkového obsahu kyselin v moštu nebo víně	Tvorba viskózních látek Tvorba biogenních aminů Tvorba etyl karbonátu Kažení chutě a vůně Tvorba kyseliny octové
<i>Lb. kunkeei</i>		Boj s kvasinkami během kvašení o živiny Nadprodukce kyseliny octové

Některé kmeny BMK mohou ve víně snížit nebo maskovat estery, což vede ke snížení odrůdových vlastností vína a ovocných vůní. Naproti tomu *O. oeni* zvyšuje množství těchto sloučenin. Může také docházet ke snížení intenzity barev, a to díky metabolické aktivitě bakterií odbourávajících fenolické sloučeniny. Bakterie JMK snižují celkové množství fenolů, což vede ke snižování trpkosti vína. Dále mohou zvyšovat polymeraci tříslovin a antokyanů. Jako vedlejší produkt metabolismu kyseliny citronové vzniká diacetyl, což je látka produkovaná mnoha BMK a vonící jako máslo. Metabolismus kyseliny citronové začíná ve stejnou dobu, kdy dochází k rozkladu kyseliny jablečné, rozklad kyseliny citronové je však pomalejší. Diacetyl se používá k aromatizaci některých vín, prahové hodnoty jsou 0,2 mg/l, v množství 2-7 mg/l ovlivní víno nepříjemnou máslovou vůní. [30]

### **2.1.2.2 Podmínky pro jablečno-mléčné kvašení**

Existuje mnoho parametrů, kterými je třeba se řídit při vedení jablečno-mléčného kvašení. Nejvíce významné jsou pH, teplota, obsah alkoholu a SO<sub>2</sub>. Je důležité s těmito čtyřmi faktory správně pracovat, mohou fungovat synergicky. Například je-li v době očkování obsah alkoholu vysoký a pH nízké, tak tento kombinovaný účinek vede k udržení růstu a metabolismu inokulovaných bakterií. Obecně platí, že pokud budou dodrženy následující podmínky tak JMK probíhá poměrně snadno: hodnota pH vyšší než 3,2, volný SO<sub>2</sub> pod 10 mg/l, teplota vyšší než 18 °C, alkoholu méně než 13% (*Obr. 1*) [25]

Obr. 1. Znázornění vzájemných účinků všech čtyř parametrů na JMK. [25]



### 2.1.3 Tvorba biogenních aminů

Biogenní aminy (BA) jakožto nízkomolekulární látky s nežádoucími fyziologickými účinky, pokud jsou obsaženy ve vysokých koncentracích. Nacházejí se v mnohých potravinách, včetně nápojů. Biogenní aminy ve víně mohou být produkovány dekarboxylací aminokyselin různými mikroorganismy spojovanými s různými fázemi výroby a skladování vína. Nicméně ne všechny kmeny bakterií se na této činnosti podílejí. V některých vínech může být velmi nízké množství biogenních aminů, zatímco v jiných může být množství větší. [32] Hlavní biogenní aminy spojované s vínem jsou putrescin, histamin, tyramin, kadaverin a fenyletylamin. Obsah biogenních aminů je mnohem vyšší ve víně než v moštu. V červených vínech je obecně vyšší obsah biogenních aminů, nejrozšířenějším je putrescin. Na začátku procesu zrání bývají produkovány hlavně histamin a tyrozin. [32,33]

Biogenní aminy jsou často produkovány bakteriemi mléčného kvašení v procesu kvašení potravin a nápojů. Kromě BMK, mohou tvořit biogenní aminy i některé kvasinky, např. *Saccharomyces*, *Brettanomyces bruxellensis*. Největšími producenty jsou však zpravidla BMK *Lactobacillus* (*Lb. hilgardii* a *Lb. buchneri*, *Lb. brevis* a *Lb. mali*), *Pediococcus* (*P. cerevisiae*, *P. parvulus*) a mnoho kmenů *O. oeni*. Tyto bakterie se schopností produkce biogenních aminů mají specifické geny a enzymy, které jim umožňují převádět aminokyse-

liny obsažené ve víně na histamin, tyramin, putrescin a kadaverin a další, které jsou škodlivé pro jakost vína. [32,33]

Zejména při nekontrolovaném růstu mikrobů se může stát úroveň biogenních aminů nebezpečná. Při absorpci vysokých koncentrací mohou způsobit bolesti hlavy, dušnost, bušení srdce, hyper- nebo hypotenzi a také alergie. Histamin je nejvíce toxický a jeho účinek může být zesílen dalšími aminy. Citlivost člověka se liší podle individuální detoxikační činnosti lidského těla. Nejcitlivějšími na kontaminaci biogenními aminy jsou vína s vysokým pH, neboť je rozmanitá mikroflóra, a pravděpodobnost přítomnosti bakterií produkujících BA je velká. Avšak i při klasickém pH vína (3,3 - 3,8) jsou rizika velká při spontánním JMK, zejména pokud je vysoká koncentrace etanolu. Nejlepším způsobem jak kontrolovat biogenní aminy je bezesporu použití startérových kultur pro JMK. Tyto startérové kultury by neměly produkovat biogenní aminy a navíc potlačují škodlivou činnost domorodé mikroflóry. [32, 34] V případě výskytu BA, mohou být odstraněny pomocí čířicích prostředků. Například na omezení histaminu je nejúčinnější použití bentoninu, aktivní uhlí je také účinné. [35,36]

### **2.1.3.1 Metody stanovení biogenních aminů ve víně**

Kvalitativní a semikvantitativní skriningové metody využívají selektivní média. Jednou z prvních metod vyvinutých pro kvalitativní detekci biogenních aminů je metoda mikrobiologického vyšetření, která zahrnuje použití agaru s pH indikátorem (bromkrezol-purpur). Prekurzory biogenních aminů (aminokyseliny) jsou rovněž obsaženy v dekarboxylačním kultivačním médiu. Zvýšením pH v důsledku formace aminu dojde ke změně barvy média. Doporučuje se však výsledky doplnit dalšími analytickými metodami (např. HPLC), protože v důsledku vzniku jiných alkalických sloučenin (např. amoniaku) mohou vzniknout falešně pozitivní výsledky. [33]

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) byla jednou z prvních technik použitých pro stanovení biogenních aminů v potravinách. Tato metoda je časově náročná a pouze semikvantitativní. [33]

Nejčastěji používaná metoda pro stanovení BA je HPLC s před- nebo postkolonovou derivací. Novou generací HPLC je technika UPLC, ta se od HPLC odlišuje menšími částicemi stacionární fáze v krátké koloně. Její výhody spočívají zejména v úspoře času analýzy, menší spotřebě rozpouštědel a také zvýšení kapacity. Dále se může použít i hmotnostní

spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI-MS), výhodou je že lze stanovit BA přímo z roztoku bez předchozí derivatizace. [37] Pro velmi rychlé selektivní stanovení se mohou použít i elektroforetické metody (zejména kapilární elektroforéza), které oproti HPLC poskytují některé výhody, např. vyšší účinnost, dále je třeba menšího objemu vzorku, vysoká selektivita a citlivost nebo krátká doba analýzy. [33, 38]

Enzymatické metody pro stanovení produkce histaminu byly nejprve používány u ryb. Aplikace těchto metod na mošty a vína přinášelo mnoho falešných výsledků. [33]

## 2.2 Významné bakterie mléčného kvašení vyskytující se ve víně

### 2.2.1 *Lactobacillus*

Bakterie rodu *Lactobacillus* představují velmi rozmanitou skupinu. Jedná se o grampozitivní, nesporulující, fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní bakterie, které se pod mikroskopem jeví jako tyčinky. [39] Obvykle tvoří řetízky. Optimální teplota pro jejich růst se pohybuje v rozmezí 30-40 °C, termofilní laktobacily mohou růst i při 55 °C, pod 15 °C většina těchto bakterií už neroste. Jsou acidotolerantní až acidofilní, zvládají tak velmi nízké pH, jsou nutričně náročné, vyžadují sacharidy, aminokyseliny, peptidy, vitaminy, mastné kyseliny, deriváty nukleonových kyselin a minerální látky.[24] Jsou obecně kataláza negativní.[39] Laktobacily můžeme nalézt zejména na místech bohatých na živiny (místa s vysokou koncentrací sacharidů, slizniční povrchy lidí a zvířat, materiály rostlinného původu). [40] Při výrobě fermentovaných potravin se využívá řada laktobacilů patřících mezi homofermentativní i heterofermentativní laktobacily (např. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus*). Na druhou stranu některé obligátně heterofermentativní laktobacily (např. *Lb. brevis*, *Lb. fructivorans*) mohou způsobovat kažení potravin. [41]

Druhy, které byly izolovány z hroznů a vína na celém světě, jsou *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. buchneri*, *Lb. cellobiosus*, *Lb. curvatus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. diolivorans*, *Lb. fructivorans*, *Lb. heterohiochii*, *Lb. hilgardii*, *Lb. jensenii*, *Lb. kunkeei*, *Lb. leichmanni*, *Lb. nagelli*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. trichodes*, *Lb. vermiforme* a *Lb. yamanashiensis*. [39]

*Lb. plantarum* ve víně rozkládá kyselinu vinnou na kyselinu octovou a oxid uhličitý. Někdy se používá jako startérova kultura při výrobě vína.[24]

### 2.2.2 *Leuconostoc*

*Leuconostoc* je grampozitivní, nepohyblivá a asporogenní bakterie. Její buňky jsou elipsoidní až kulovité, často protáhlé a obvykle se vyskytují ve dvojicích nebo v řetězcích. Patří mezi mezofilní mikroorganismy, s optimem růstu mezi 18 - 25 °C, některé kmeny jsou schopny růstu i při 10 °C. [42] Jsou fakultativně anaerobní, kataláza negativní. Glukóza je fermentována na stejné množství D-kyseliny mléčné, CO<sub>2</sub> a etanolu nebo acetátu. Některé kmeny produkují enzym dextransacharázu, díky němuž tvoří na povrchu buněk dextranový sliz. [43] Druh *L. mesenteroides* zahrnuje tři nejvýznamnější poddruhy: *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* a *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* bývá ve víně a nealkoholických ovocných šťávách nežádoucí a to vzhledem ke schopnosti disimilace citrátu za tvorby diacetylu, acetoinu a 2,3-butylen glykolu. [10, 44]

Pro *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* je charakteristická tvorba dextranového slizu, jehož přítomnost ve víně a dalších nealkoholických ovocných nápojích je nežádoucí, může způsobit houstnutí nápojů. [10,44]

### 2.2.3 *Oenococcus*

Vinné bakterie patřící do rodu *Oenococcus* byly dříve klasifikovány jako *Leuconostoc gracile*, *Leuconostoc citrovorum* a *Leuconostoc oenos*. Fylogenetické studie však prokázaly že, *L. oenos* představuje výraznou sublinii oddělenou od ostatních *Leuconostoc* spp. Toto zjištění vedlo k převedení této bakterie do nového rodu *Oenococcus*. *O. oeni* má vysokou úroveň vnitrodruhové genomové rozmanitosti. Bakterie *O. oeni* jsou popisovány jako grampozitivní, fakultativně anaerobní, kataláza negativní, elipsoidní až kulovité buňky, které se obvykle vyskytují v párech nebo v řetězcích. Jedná se o heterofermentativní druh, který přeměňuje glukózu na ekvimolární množství především D-kyseliny mléčné, CO<sub>2</sub> a etanolu nebo acetátu. Bakterie produkují plyn z glukózy, hydrolyzují eskulin, mohou tvořit amoniak z argininu. Optimum růstu je okolo 22 °C. [39]

*O. oeni* je acidofilní bakterie tolerantní k alkoholu, která hraje významnou roli při výrobě vína. Často bývá přidávána jako startovací kultura pro zahájení JMK a to díky své odolnosti vůči vysokým koncentracím etanolu (až okolo 15 %), a toleranci k nízkému pH okolo 2,9. Převádí kyselinu L-jablečnou na kyselinu L-mléčnou a CO<sub>2</sub>. Celkový dopad na víno je do značné míry závislé na konkrétním kmenu. [45]

#### 2.2.4 *Pediococcus*

Rod *Pediococcus* jsou grampozitivní, nepohyblivé kulovité bakterie, které tvoří tetrády. Jsou kataláza a oxidáza negativní, fakultativně anaerobní, homofermentativní a z glukózy produkují DL-laktát jako hlavní konečný produkt fermentace. Fermentují také fruktózu, manózu a celobiózu a většinou také galaktózu a maltózu (*P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. clausenii* tuto schopnost postrádají). Pyruvát mohou měnit na další konečné produkty, jako jsou diacetyl a acetoin, (*P. damnosus*). Některé kmeny pediokoků jsou značně odolné vůči teplotě, pH a NaCl. Rostou při pH kolem 5. [43] Pediokoky se často nachází v nízkých počtech společně s laktobacily a leukonostoky na rostlinných materiálech, potravinách a jako škodliví činitelé v alkoholických nápojích. Jsou považovány za důležité startérové bakterie využívané při výrobě fermentovaných masných výrobků, některé kmeny *P. acidilactici* a *P. pentosaceus* produkují bakteriociny. [41] Ve víně se vyskytují zejména druhy *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, *P. damnosus*, *P. inopinatus*. [10] Pokud se pediokoky ve víně vyskytují v přiměřeném množství, tak se zúčastňují odbourávání kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou a CO<sub>2</sub>. Při příliš vysokém obsahu pediokoků ve víně dochází k produkci acetoinu a diacetylu, které jsou nežádoucími látkami ve víně.[44]

*P. cerevisiae* má na víno negativní vliv vzhledem k tomu, že způsobuje vláčkovatění, vytváří se řetízky (vláčky) slizu. Jeho přemnožení hrozí zejména u vín s nízkým obsahem kyselin a vyšším zbytkem cukru. Kontaminovaná vína jsou značně viskózní a při zamíchání je pozorován pohybující se jemný zákal. Víno postihnuté touto bakterií lze upravit provzdušněním při stáčení, přetočením do silně zasířeného sudu a překvašením zdravými kvasnicemi. [46]

#### 2.2.5 *Weissella*

Rod *Weissella* je grampozitivní, nepohyblivá, kataláza negativní bakterie. Tvoří krátké tyčinky. Vyskytují se v párech, nebo krátkých řetízcích. Jsou fakultativně anaerobní., heterofermentativní. V závislosti na kmenu produkují kyselinu mléčnou v konfiguraci DL- nebo D. Při svém růstu mají vysoké požadavky na nutriční látky, zejména aminokyseliny, peptidy, fermentovatelné cukry, tuky, nukleové kyseliny a vitaminy. K růstu dochází při 15 °C, některé mohou růst i při 42 - 45 °C. [43]

### 2.3 Bakterie octového kvašení

Bakterie octového kvašení se spojují s vínem jako kontaminující mikroflóra tvořící kyselinu octovou, acetaldehydy a etylacetát. [19] Bakterie octového kvašení (BOK) tvoří velkou skupinu gramnegativních aerobních bakterií se schopností oxidovat etanol na kyselinu octovou. Jsou pohyblivé pomocí polárních nebo pertrichálních bičíků. Jsou kataláza pozitivní, oxidáza negativní. Optimální teplota pro růst je 25 - 30°C a optimální pH 5 - 6, i když mohou růst i při pH pod 4. Jsou rozšířeny na přírodních materiálech. Jako zdroj energie využívají glukózu, etanol, laktát a glycerol. Většina z těchto látek je oxidována na CO<sub>2</sub>, vodu a další metabolity, zejména kyselinu octovou a hromadí se v růstovém médiu. [47] Nutriční požadavky se liší v závislosti a dostupných zdrojích uhlíku. Některé kmeny vyžadují p-aminobenzoové kyseliny, niacin, thiamin, nebo kyselinu pantotenovou. BOK pro svůj růst běžně vyžadují kyslík, pokud je omezen kontakt kyslíku s vínem, může docházet k omezení růstu těchto bakterií. [39] Mnoho druhů bakterií octového kvašení se nachází na hroznech a doprovázejí výrobu vína už od sklizně. Nadále rostou v moštu, který nebyl zasířen, obecně se jejich množství sníží při kvašení v důsledku anaerobních podmínek. Při nedodržení technologických operací se mohou BOK obnovit v důsledku přístupu kyslíku. Zabránit znehodnocení vína octovými bakteriemi lze především vhodnými skladovacími podmínkami. Je důležité víno udržovat v zapečetěných nádobách. BOK jsou také méně aktivní při nízkém pH, při pH 3 se téměř nevyskytují. Jsou citlivé také na teplotu, při teplotách kolem 15 °C nerostou dobře. Nejlepší ochranou před BOK je použití siřičitanu. [48] Z vína byly izolovány například *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *Gluconacetobacter liquefaciens* (dříve *A. liquefaciens*), a *Gluconacetobacter hansenii* (dříve *A. hansenii*) [39]

### 2.4 Kvasinky

Kvasinky se vyskytují na povrchu hroznů a v prostředí vinice, na hrozny se dostávají za pomoci větru a hmyzu. Z počátku zrání ovoce je převládajícím druhem *Kloeckera apiculata* v množství až 50 %. V omezeném množství se vyskytují i jiné druhy, které se řadí mezi rody *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Issatchenikia*, *Kluveromyces*, *Metchnikowia*, *Pichia* a *Rhodotorula*. Fermentativní druhy *Sacharomyces cerevisiae* a *Sacharomyces bayanus* jsou přítomny v omezeném množství. Tuto mikroflóru ovlivňuje široká škála faktorů a to zejména teplota, srážky, nadmořská výška, zralost plodiny a použití



fungicidů. Kvasinky přítomné v moštu během prvních několika hodin po naplnění do nádrží patří ke stejným druhům, které byly nalezeny na hroznech. Jsou to převážně *Hanseniaspora* a *Kloeckera*. Za těchto spontánních podmínek se kvasinky *Saccharomyces* začnou rozvíjet zhruba po 20 hodinách. Po 3 až 4 dnech kvašení kvasinka *Sacharomyces* převládá a je zodpovědná za alkoholové kvašení. Tuto změnu v populaci kvasinek způsobuje rostoucí přítomnost etanolu, anaerobní podmínky, síření, koncentrace cukru a větší tolerance k vyšším teplotám. V současné době se ve vinařství využívá metoda očkování kvasinek, které jsou ve formě aktivně sušených kvasinek. Tato metoda zkracuje lag-fázi, zajišťuje rychlé a kompletní kvašení moštu a pomáhá vytvořit mnohem více reprodukovatelných finálních produktů. Výběr vinných kvasinek se specifickými genetickými markery zajišťuje během kvašení monitorovaný růst vybraných kmenů. Fermentace je urychlena zejména inokulovanými kvasinkami, avšak růst původní mikroflóry v prvních dnech kvašení není zcela potlačen a může také ovlivnit vlastnosti vína. Doporučuje se používat směsné kultury, které musí být pečlivě vybrány na základě určitých potřebných vlastností, které mají vliv na výsledný charakter vína. [19]

Kvasinky *Saccharomyces* jsou metabolicky významné při fermentaci vína, některé z těchto druhů jsou však omezeny ve schopnosti plně zkvašovat hroznovou šťávu a produkovat z cukru dostatečnou koncentraci etanolu. Některé mohou růst pomalu ve srovnání s ostatními původními kvasinkami a nemusí se usadit. Jiné kmeny mají vlastnosti, které lze využít při výrobě vína. Například některé kmeny *Hanseniaspora* / *Kloeckera* tvoří více atraktivní směsi těkavých látek určených k aromatizaci a vyšší množství glukozidázy a proteázy než druh *Saccharomyces*. *Candida zemplinina* produkuje více glycerolu, *Kluyveromyces thermotolerans* vytváří vyšší koncentraci kyseliny mléčné. *Torulaspora delbrueckii* produkuje méně kyseliny octové a druhy *Schizosaccharomyces* snižují kyselost vína pomocí metabolismu kyseliny jablečné. Mnoho studií se snaží pochopit, jak ostatní druhy kvasinek rostou společně se *S. cerevisiae* a jak se vzájemně ovlivňují. [49]

Během výroby vína vykazují kvasinky jak prospěšnou tak i škodlivou aktivitu. *Sacharomyces cerevisiae* je hlavní kvasinka zodpovědná za přeměnu hroznové šťávy na víno, tento druh a mnohé další se však mohou projevit i nežádoucími účinky. Druhy rodů *Kloeckera*, *Hanseniaspora* jsou časté na povrchu hroznů a ve šťávě po rozdrcení hroznů. Tyto druhy lze snadno regulovat adekvátním vinařským opatřením (nízká teplota, oxid siřičitý, hygie-

na) a během kvašení je tlumena výroba nežádoucích metabolitů jako je etylacetát (způsobující zápach po octu).[50]

#### 2.4.1 *Dekkera*

Mnozí vinaři považují *Brettanomyces* a její sporulující ekvivalent *Dekkera* za hrozbu pro kvalitu vína. Po celém světě v důsledku kontaminace těmito kvasinkami bývají způsobeny velké ekonomické ztráty, jelikož mohou vína zkazit a učinit je neprodejnými nebo sníží jejich kvalitu a tím sníží i tržní cenu. Určitá míra infekce však může být prospěšná pro určité druhy vína. Hrají pozitivní roli při zrání některých mladých červených vín. [39]

#### 2.4.2 *Hanseniaspora*

*Hanseniaspora* tvoří vejčité a kulovité buňky. Na hroznech se nejčastěji nachází *H. uvarum*. Tyto druhy využívají různé dusíkaté látky zahrnující kadaverin, L-lyzin, etylamin, a tolerují i 10 mg/l cykloheximidinu. Některé druhy produkují červený/hnědý pigment.[39]

#### 2.4.3 *Pichia*

Řada druhů *Pichia* může být nalezena ve víně, jako např. *P. anomala*, *P. membranifaciens*. *P. guilliermondii* se do moštu může dostat z vinařského vybavení. Buňky se jeví pod mikroskopem jako oválné, elipsoidní nebo válcové a množí se vegetativně. Kolonie na pevných médiích jsou bílé nebo krémové a obvykle vrásčité. V závislosti na druhu mohou zkvašovat různé cukry a asimilovat dusičnany. [39]

### 2.5 Plísně

Ke kontaminaci hroznů různými druhy plísní dochází před sklizní, v průběhu sklizně a zpracování hroznů. Růst plísní na hroznech začíná při vhodné teplotě a vlhkosti. Znehodnocení hroznových bobulí před sklizní mohou způsobit rody *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Penicillium* a *Rhizopus*. Tyto rody jsou považovány za hlavní kontaminanty hroznů. V důsledku jejich růstu mohou být produkovány sekundární metabolity plísní - mykotoxiny. Ochratoxin A se vyskytuje v hroznech révy vinné i ve víně. Jeho zdrojem jsou zejména kmeny *Aspergillus* (*A. carbonarius* napadá hrozny hlavně před sklizní a *A. niger*, *A. ochraceus*). V době sklizně se zvyšuje obsah cukru v hroznech a tím jsou nejvíce náchylné k infekci *A. carbonarius* a zároveň je podpořena produkce ochrato-

xinu A. Toto riziko se zvyšuje zejména při poškození nebo opožděné sklizni zralých hroznů. *Penicillium verrucosum* je jediným druhem z rodu *Penicillium* schopným produkovat ochratoxin. Mykotoxiny jako patulin, aflatoxin a citrinin jsou v hroznech a vínech méně časté. Patulin může produkovat kmen *Penicillium expansum*. Citrinin produkují různé druhy *Penicillium*, *Aspergillus* a *Monascus*. Producenti aflatoxinu jsou *A. flavus*, *A. parasiticus*. Na hroznech postižených šedou hnilobou (*Botrytis cinerea*) se vyskytuje *Trichothecium roseum* který je zdrojem mykotoxinu trichotecinu. Nicméně tento mykotoxin se vyskytuje u vína jen zřídka. Ochratoxin A je mykotoxin nefrotoxický, teratogenní a imunosupresivní. Aflatoxiny jsou silnými karcinogeny. Patulin způsobuje gastrointestinální problémy, kožní vyrážky, a je mutagenní. Citrinin je hepatonefrotoxický. [51]

*Botrytis cinerea* je původcem šedé plísně hroznů, je zodpovědná za významné ekonomické ztráty ve vinařství po celém světě. Ve vlhkém prostředí jsou vytvořeny podmínky pro houbovou penetraci a uvolnění živin z bobulí hroznů. Nejefektivnějším způsobem jak zabránit tomuto onemocnění je použití fungicidů a chemická kontrola. Vzhledem ke zvýšené rezistenci na fungicidy je zajímavou alternativou ke konvenčním metodám biologická kontrola. Hlavní zásady biologické kontroly spočívají v použití živých mikroorganismů, jejich produktů a použití biologického procesu ke kontrole populací škůdců.[52]

### 3 CHOROBY A VADY VÍNA ZPŮSOBENÉ MIKROORGANIZMY

Pro výrobu kvalitního vína je potřeba, aby zpracovávaná surovina, tedy hrozny révy vinné byly zdravé, vyzrálé a mechanicky nepoškozené. V tomto případě se dá očekávat normální vývoj vína. Při neodborné manipulaci a špatném ošetřování se může víno zkazit, zejména pokud hrozny neodpovídají kvalitativním požadavkům na výrobu vína. Může vzniknout víno vykazující určité vady. Choroby vína bývají způsobeny mikroorganismy a mohou víno poškodit až tak, že se stává nepoživatelným. Nejčastějšími chorobami vína jsou křísivatění, octovatění, vláčkovitost, mléčné a manitolové kvašení, myšina. Vady vína vznikají během technologického procesu výroby vína a jsou výsledkem nesprávného a nedbalého zacházení s vínem, moštem a rmutem. Základem prevence je dostatečná čistota, hygiena prostředí a veškerého nářadí a vybavení sklepa. Víno jakožto produkt vyrobený pomocí živých mikroorganismů je velmi citlivé a v případě styku s nevhodným materiálem snadno přebírá různé pachy, příchutě a díky kyselinám také snadno reaguje. Vznikají kovové zákalů, příchut' sirovodíku, po korku, sudovina. Mnoho chorob i vad vzniká v důsledku nadměrného působení kyslíku na víno. [53]

#### 3.1 Myšina

Tato typická choroba, zejména ovocných vín, patří mezi nepříjemné choroby vína, projevující se zápachem po „myší moči“ s tóny zatuchlosti připomínající dlouho nevětranou místnost. Za hlavní původce této choroby se považují mléčné bakterie – rody *Lactobacillus*, *Oenococcus* a druh *Leuconostoc mesenteroides*. Dalším původcem mohou být v chladnějších vinařských oblastech i kvasinky rodu *Brettanomyces*. Nejčastěji se vyskytuje u mladých vín se zbytkovým cukrem, s nízkým obsahem kyselin, u kterých probíhalo kvašení při vysokých teplotách. Tato choroba je z vína neodstranitelná, mohou se proti ní chránit dobrým sířením nebo kvašením pod kvasnou zátkou při teplotách kolem 18 °C a také včasným přetočením mladého vína z kvasničných kalů. [10]

#### 3.2 Křís

Vína, která mají nízký obsah alkoholu, mohou být za přístupu vzduchu napadena křísovitými kvasinkami. Způsobují je nejčastěji následující druhy kvasinek: *Pichia membranaefaciens*, *Pichia fermentans*, *Candida vini*, *Candida zeylanoides*, *Metschnikowia pulcherrima*.

ma, *Debaryomyces hansenii*. Rozkládají alkohol i kyseliny obsažené ve víně na vodu a oxid uhličitý. Během toho vytváří na víně mázdrovitý povlak označovaný jako křís, ten může často narůstat i na stěnách nádoby nad vínem. Vlivem křisovatění je porušena chuť i vůně vína. Dá se mu předcházet pravidelným doplňováním nádob s vínem s vyšším sířením. Důležité je také víno skladovat při správné teplotě. Teploty vyšší než 20 °C podporují rozvoj kvasinek a tím i tuto chorobu vína. [10, 54]

### 3.3 Vláčkovatění vín

Jedná se o nemoc projevující se změnou konzistence, ta se stává olejovitou a následně se dá víno vytahovat jako vlákno. Původcem jsou bakterie tvořící na povrchu sliz. Tato choroba postihuje zejména mladá vína nebo vína ležící delší dobu na kvasničných kalech a vína s nízkým obsahem tříslovin. Při delším trvání choroby víno ztrácí svůj charakter, stává se mdlým a fádším. [54]

### 3.4 Vady vína způsobené nesprávnou fermentací

Zvrhnutí vína je choroba postihující červená vína. Způsobují ji mikroorganismy štěpící kyselinu vinnou a vinný kámen na kyselinu octovou, mléčnou, propionovou a oxid uhličitý. Vlivem této choroby víno hořkne a červená barva přechází do hnědého odstínu. [54]

Metabolizováním cukrů, jako jsou glukóza a fruktóza, produkují BMK kyselinu mléčnou a kyselinu octovou. Víno získává kyselou chuť a octové aroma. Jedná se o závažné znehodnocení zejména u vín s vyšším zbytkovým cukrem (sladká vína). Méně závažným znehodnocením je u vín suchých kde vznik těchto kyselin zvyšuje titrační kyselost a snižuje pH, což omezuje růst těchto mikroorganismů. [55]

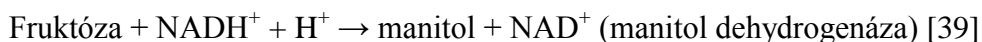
Další vadou je rozklad kyseliny vinné. U tohoto druhu kažení BMK kvasí kyselinu vinnou a tvoří kyselinu mléčnou, kyselinu octovou a oxid uhličitý. Odbourávání kyseliny vinné se vyskytuje zejména u vín s nízkým obsahem kyselin a vysokým pH (pH nad 3,5). Titrační kyselost je dále snížena a chuť a vůně vína se stále zhoršuje, mění se z mdlé na ostrou až zápach. Vnější znakem této choroby je změna červené barvy na hnědou a vytvoření šedo-hnědého zákalu. [55]

Některé bakterie mohou metabolizovat kyselinu citronovou. Obsah kyseliny citronové se může snížit během JMK. Závisí to druhu bakterií a pH vína. Rozklad kyseliny citronové souvisí s tvorbou diacetylu a acetonu stejně jako kyseliny octové. [55]

Kyselina octová je hlavní těkavou kyselinou vína. Vzniká v průběhu kvašení jako vedlejší produkt. Rozsah tvorby je 200 – 400 mg/l, v tomto množství nemá vliv na kvalitu vína. Je produkována BMK, BOK. Růst bakterií octového kvašení ve víně a v moštu může výrazně zvýšit obsah těkavých kyselin. Pokud je kyselina octová přítomna v množství 600 – 700 mg/l, je ve víně patrná a znehodnocuje jej. [48]

Rozložení glycerolu pomocí BMK vede k tvorbě kyseliny mléčné, kyseliny octové a akroleinu. Víno voní octově, máselně a získává nahořklou chuť kvůli akroleinu. [55]

Ve víně je rovněž nežádoucí manitol. Manitol vyrábí některé bakterie mléčného kvašení z fruktózy podle následující reakce:



*Brettanomyces*, jsou kvasinky, které se někdy vyskytují na slupkách hroznů, nebo ve víně. Jejich výskyt podporuje i sklepní nečistota a rovněž je přenáší vinné mušky *Drosophila melanogaster*. Jsou citlivé k SO<sub>2</sub>. Tvoří čtyři produkty, které mohou negativně ovlivnit chuť a vůni vína: esterázy, těkavé mastné kyseliny, tetrahydropyridiny a těkavé fenoly. [56]

### 3.5 Další vady vína

Hnědnutí vína se projevuje zejména u vín mladých a málo sířených a je způsobeno přístupem vzduchu. Dochází ke změně původní barvy, a víno získává nahnědlý odstín. Černé zákaly se vyskytují u červených vín a jsou způsobeny vysokým obsahem kovů. Dále se mohou vyskytovat bílé zákaly a krystalizační zákaly. Vada, vyznačující se zápachem zkažených vajec, se označuje jako „sirka“. Zápach je způsoben sirovodíkem vznikajícím činností kvasinek. Do vad v příchuti patří příchut' po třapinách, po trávě, po acetonu, mrazová a zemitá příchut'. Dále také příchut' po kvasinkách a plísních, po korku aj. Při vysokém obsahu kyselin je víno tvrdé, způsobuje to výroba z nezralých hroznů. Dále může víno negativně ovlivňovat jak nízký obsah alkoholu, tak i vysoký obsah alkoholu a stejně tak nízký obsah extraktu. [57]

## **PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo provedení mikrobiologické analýzy vybraných vzorků vín a studium tvorby biogenních aminů bakteriemi izolovanými z vzorků vín.

Pro dosažení cílů bylo třeba:

- vypracovat rešerši týkající se problematiky mikrobiologie vína,
- stručně popsat význam a zastoupení bakterií ve víně,
- popsat problematiku tvorby biogenních aminů ve víně.

Pro vypracování praktické části diplomové práce bylo nutné naplnit tyto dílčí cíle:

- stanovit počty mikroorganismů v jednotlivých vzorcích vín,
- morfologická charakterizace kmenů bakterií vybraných z jednotlivých vzorků vín,
- otestovat bakterie na dekarboxylázovou aktivitu,
- na základě získaných výsledků zformulovat závěr.



## 5 MATERIÁL A METODIKA

### 5.1 Analyzovaný materiál

K analýze byly použity dvě série vzorků vína. První řada vín (vzorky číslo 1 – 52; Tab. 3 - Tab. 5) jsou vína, které poskytl doc. Balík ze Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity. Všechny vzorky pocházely z téhož vína. Jednalo se o Frankovku, objem kádi byl 1000 litrů.

Druhá řada vín (vzorky označené X1- X84) byla vína, která byla získána od dvou vinařů z Polešovic. Po proběhnutí hlavního kvašení byla vína stáhnuta z kvasnic a zaočkována kulturou. Oba vinaři zaočkovali 2 odrůdy a to Zweigeltrebe a Cabernet Moravia kulturou BioStart® Forte SK2 (odolný kmen *Oenococcus oeni* určený pro biologické odbourávání kyseliny jablečné pro bílá a červená vína; Erbslöh, SRN). Od každého vína byly analyzovány i kontrolní vzorky, které byly ponechány bez očkování (tabulka 6 a 7).

Všechny vzorky byly od odběru až do doby provedení experimentu skladovány v mrazničce při teplotě  $-18 \pm 2$  °C.

Tab. 3. Vzorky vín odebrané z vany 4; inokulované – Lalvin 31 *Oenococcus oeni*.

Číslo vzorku	Datum odběru	Teplota vany [°C]	Poznámka
<b>1</b>	<b>27.10.2008</b>	10	
<b>2</b>	<b>28.10.2008</b>	12,4	
<b>3</b>	<b>29.10.2008</b>	13,9	
<b>4</b>	<b>3.11.2008</b>	21,7	
<b>5</b>	<b>4.11.2008</b>	29,6	Inokulace – Lalvin 31 <i>Oenococcus oeni</i> , Lallemand (Francie)
<b>6</b>	<b>5.11.2008</b>	28,0	
<b>7</b>	<b>6.11.2008</b>	25,0	
<b>8</b>	<b>7.11.2008</b>	24,5	
<b>9</b>	<b>8.11.2008</b>	23,5	
<b>10</b>	<b>10.11.2008</b>	22,4	
<b>11</b>	<b>11.11.2008</b>	21,8	
<b>12</b>	<b>18.11.2008</b>	18,3	
<b>13</b>	<b>28.11.2008</b>	14,6	
<b>14</b>	<b>5.12.2008</b>	13,5	
<b>15</b>	<b>6.1.2009</b>	12,1	
<b>16</b>	<b>12.1.2009</b>	14,5	
<b>17</b>	<b>27.1.2009</b>	15,6	
<b>18</b>	<b>4.2.2009</b>	14	

Tab. 4. Vzorčky vín odebrané z vany 3; inokulované – Lalvin 31 *Oenococcus oeni*.

Číslo vzorku	Datum odběru	Teplota vany [°C]	Poznámka
19	27.10.2008	10	
20	28.10.2008	18	
21	29.10.2008	20,5	
22	3.11.2008	30,0	Inokulace – Lalvin 31 <i>Oenococcus oeni</i> , Lallemand (Francie)
23	4.11.2008	23,5	
25	6.11.2008	21,2	
26	7.11.2008	21,8	
27	8.11.2008	23,5	
28	10.11.2008	25,1	
29	11.11.2008	21,0	
32	5.12.2008	16,4	
33	6.1.2009	10,7	
34	12.1.2009	6,4	
35	27.1.2009	8,9	
36	3.2.2009	7	

Tab. 5. Vzorčky vín odebrané z vany 5; inokulované: BioStart.

Číslo vzorku	Datum	Teplota vany [°C]	Poznámka
37	3.11.2008	21,8	
38	4.11.2008	31,7	Inokulace: Biostar vitale sk11, Erbslöh
39	4.11.2008	29,6	
40	5.11.2008	31,7	
41	6.11.2008	30,7	
42	7.11.2008	29,6	
43	8.11.2008	26,4	
44	10.11.2008	23,2	
45	11.11.2008	21,9	
46	18.11.2008	14,1	
47	28.11.2008	13,5	
48	5.12.2008	13,0	
49	6.1.2009	11,0	
50	12.1.2009	9,1	
51	27.1.2009	12,4	
52	4.2.2009		

Tab. 6. Analyzované vzorky získané od prvního vinaře

Datum odběru	Číslo	Víno	
7.12.	X1	Cabernet Moravia	očkování, BioStart Forte SK2
10.12.	X2	Cabernet Moravia	zaočkované
13.12.	X3	Cabernet Moravia	zaočkované
16.12.	X4	Cabernet Moravia	zaočkované
19.12.	X5	Cabernet Moravia	zaočkované
21.12.	X6	Cabernet Moravia	zaočkované
23.12.	X7	Cabernet Moravia	zaočkované
27.12.	X8	Cabernet Moravia	zaočkované
30.12.	X9	Cabernet Moravia	zaočkované
3.1.	X10	Cabernet Moravia	zaočkované
7.1.	X11	Cabernet Moravia	zaočkované
10.12.	X12	Cabernet Moravia	kontrola
13.12.	X13	Cabernet Moravia	kontrola
16.12.	X14	Cabernet Moravia	kontrola
19.12.	X15	Cabernet Moravia	kontrola
21.12.	X16	Cabernet Moravia	kontrola
23.12.	X17	Cabernet Moravia	kontrola
27.12.	X18	Cabernet Moravia	kontrola
30.12.	X19	Cabernet Moravia	kontrola
3.1.	X20	Cabernet Moravia	kontrola
7.1.	X21	Cabernet Moravia	kontrola
7.12.	X22	Zweigeltrebe	očkování, BioStart Forte SK2
10.12.	X23	Zweigeltrebe	zaočkované
13.12.	X24	Zweigeltrebe	zaočkované
16.12.	X25	Zweigeltrebe	zaočkované
19.12.	X26	Zweigeltrebe	zaočkované
21.12.	X27	Zweigeltrebe	zaočkované
23.12.	X28	Zweigeltrebe	zaočkované
27.12.	X29	Zweigeltrebe	zaočkované
30.12.	X30	Zweigeltrebe	zaočkované
3.1.	X31	Zweigeltrebe	zaočkované
7.1.	X32	Zweigeltrebe	zaočkované
10.12.	X33	Zweigeltrebe	kontrola
13.12.	X34	Zweigeltrebe	kontrola
16.12.	X35	Zweigeltrebe	kontrola
19.12.	X36	Zweigeltrebe	kontrola
21.12.	X37	Zweigeltrebe	kontrola
23.12.	X38	Zweigeltrebe	kontrola
27.12.	X39	Zweigeltrebe	kontrola
30.12.	X40	Zweigeltrebe	kontrola
3.1.	X41	Zweigeltrebe	kontrola
7.1.	X42	Zweigeltrebe	kontrola

Tab. 7. Analyzované vzorky vína získané od druhého vinaře

Datum oděru	Číslo	Víno	
27.10.	X43	Zweigeltrebe	očkování, BioStart Forte SK2
10.11.	X44	Zweigeltrebe	kontrola
24.11.	X45	Zweigeltrebe	kontrola
8.12.	X46	Zweigeltrebe	kontrola
22.12.	X47	Zweigeltrebe	kontrola
5.1.	X48	Zweigeltrebe	kontrola
19.1.	X49	Zweigeltrebe	kontrola
2.2.	X50	Zweigeltrebe	kontrola
16.2.	X51	Zweigeltrebe	kontrola
2.3.	X52	Zweigeltrebe	kontrola
16.3.	X53	Zweigeltrebe	kontrola
10.11.	X54	Zweigeltrebe	zaočkované
24.11.	X55	Zweigeltrebe	zaočkované
8.12.	X56	Zweigeltrebe	zaočkované
22.12.	X57	Zweigeltrebe	zaočkované
5.1.	X58	Zweigeltrebe	zaočkované
19.1.	X59	Zweigeltrebe	zaočkované
2.2.	X60	Zweigeltrebe	zaočkované
16.2.	X61	Zweigeltrebe	zaočkované
2.3.	X62	Zweigeltrebe	zaočkované
16.3.	X63	Zweigeltrebe	zaočkované
24.11.	X64	Cabernet Moravia	očkování, BioStart Forte SK2
8.12.	X65	Cabernet Moravia	kontrola
22.12.	X66	Cabernet Moravia	kontrola
5.1.	X67	Cabernet Moravia	kontrola
19.1.	X68	Cabernet Moravia	kontrola
2.2.	X69	Cabernet Moravia	kontrola
16.2.	X70	Cabernet Moravia	kontrola
2.3.	X71	Cabernet Moravia	kontrola
16.3.	X72	Cabernet Moravia	kontrola
30.3.	X73	Cabernet Moravia	kontrola
13.4.	X74	Cabernet Moravia	kontrola
8.12.	X75	Cabernet Moravia	zaočkované
22.12.	X76	Cabernet Moravia	zaočkované
5.1.	X77	Cabernet Moravia	zaočkované
19.1.	X78	Cabernet Moravia	zaočkované
2.2.	X79	Cabernet Moravia	zaočkované
16.2.	X80	Cabernet Moravia	zaočkované
2.3.	X81	Cabernet Moravia	zaočkované
16.3.	X82	Cabernet Moravia	zaočkované
30.3.	X83	Cabernet Moravia	zaočkované
13.4.	X84	Cabernet Moravia	zaočkované

## 5.2 Použitý materiál

Analytické váhy KERN 440-47 N, Německo

Analytické váhy Sartorius Basic Plus, Německo

Laboratorní váhy KERN 572, Německo

Mikroskop laboratorní Motic BA200

Vortex Heidolph, Reax top, Německo

Autokláv Varioklav H+P, Německo

Automatické mikropipety Hirschmann, Německo

Automatické mikropipety Nichipet EX, Japonsko

Automatický dávkovač Dispensette BRAND, Německo

Automatický sterilizátor klíčků, Sklární kavalier, Votice

Biohazard box EUROFLOW, Clean Air, Holandsko

Biologický termostat BT 120, Česká republika

Fotoaparát Olympus C3040, Japonsko

Chladnička Electrolux

Laboratorní plasty (špičky pro automatické mikropipety, mikrotitrační destičky, eppendorfkové mikrozkušovací)

Ostatní běžné laboratorní pomůcky a vybavení

## 5.3 Použité chemikálie

Benzín, Ing. Bacílek Jaromír, CSc. – Dorapis Brno

Bromkresol purpur, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Destilovaná voda

D-glukóza, Lachema a.s., Brno

Ethanol denaturovaný 96%, ing. Petr Lukeš

Glycerol, ing. Petr Lukeš

Imerzní olej, PENTA, Praha

Methylenová modř, Sigma-Aldrich

Tween 80, Sigma-Aldrich

## 5.4 Živná média

V diplomové práci byly sledovány určité skupiny bakterií, které se mohou ve víně přirozeně vyskytovat nebo které mohou víno kontaminovat. Pro potlačení ostatní mikroflóry (zejména kvasinek a plísní) bylo ke všem půdám ještě před autoklávováním přidáno anti-mykotikum cyklohexinidin (Sigma-Aldrich) v koncentraci 50 mg/l. Dle potřeby byly půdy připravovány jako tuhé půdy s agarem nebo ve variantě bujónu (bez agaru). Pokud byly používány obě varianty, je uváděno složení tuhé půdy.

Pro stanovení celkového počtu bakterií ve vzorcích vína bylo použito živné médium Plate Count Agar (PCA; HiMedia, Bombai, Indie) o složení:

PCA	23,5 g
Cyklohexinidin	50 mg
Destilovaná voda	1000 ml
Konečné pH (při 25°C)	7± 0,2

Pro stanovení počtu laktobacilů byla použita půda MRS (deMan, Rogosa a Sharpe; HiMedia) jejíž složení bylo následující:

MRS broth	55 g
Agar	15 g
Cyklohexinidin	50 mg
Destilovaná voda	1000 ml
Konečné pH (při 25°C)	6,2± 0,2

Pro stanovení přítomnosti mléčných koků (laktokoků, oenokoků a dalších) byly použity diagnostické půdy M17 (HiMedia) a Tomato juice Agar (TJA, HiMedia) jejichž příprava byla následující:

TJA	40 g
Cyklohexinidin	50 mg
Destilovaná voda	1000 ml

## M17

M17 broth	37,3 g
Laktóza	5 g
Agar	15 g
Cyklohexinidin	50 mg
Destilovaná voda	1000 ml
Konečné pH (při 25°C) $6,9 \pm 0,2$	

Pro stanovení kontaminujících gramnegativních bakterií octového kvašení byly použity následující dvě půdy:

## ACETOBACTER - GLUCONOBACTER AGAR (AGA)

Yeast extract (HiMedia)	10 g
Glukóza (LachNer)	150 g
CaCO <sub>3</sub> (LachNer)	20 g
Agar	20 g
Cyklohexinidin	50 mg
Destilovaná voda	1000 ml
Konečné pH (při 25°C) $7,4 \pm 0,2$	

## ACETOBACTER AGAR (AA)

Yeast extract (HiMedia)	10 g
Glukóza (LachNer)	3 g
CaCO <sub>3</sub> (LachNer)	10 g
Agar	15 g
Cyklohexinidin	50 mg
Destilovaná voda	1000 ml
Konečné pH (při 25°C) $7,4 \pm 0,2$	

Pro pomnožení běžných bakterií byl použit Nutrient Broth (HiMedia).

Nutrient Broth	13 g
destilovaná voda	1000 ml

## 6 POUŽITÉ METODY

### 6.1 Statická kvantitativní kultivace

Pro stanovení počtu životaschopných buněk bakterií ve vzorcích vína byla použita nepřímá metoda, která spočívá v počítání viditelných makroskopických kolonií vyrostlých na agarových plotnách. Metoda je založena na předpokladu, že z jedné životaschopné buňky vyroste jedna kolonie. Jednotlivé kolonie byly spočítány a přepočteny na 1 ml původního vzorku vína. [58]

Sterilizace kultivačních médií byla provedena autoklávováním po dobu 15-20 minut za teploty 121 °C. Stanovení počtu bakterií bylo prováděno za aseptických podmínek. Na vysterilizovaná média AGA, AA, PCA a M17 bylo sterilními špičkami pipetováno 0,1 ml a 0,5 ml vína. Toto množství bylo rovnoměrně rozetřeno pomocí skleněné hokejky. Na agarové plotny MRS, TJA bylo pipetováno množství 0,5 ml a 1 ml. Po úplném vsáknutí vzorku na agarových plotnách proběhla následná kultivace, která byla provedena v termostatu při teplotě  $30 \pm 0,2$  °C po dobu nezbytnou pro nárůst kolonií (48 – 96 hodin). Petriho misky byly uloženy v termostatu dnem vzhůru. [58, 59]

Počet vyrostlých kolonií byl zjišťován po inkubaci při optimální teplotě po dobu 48 - 96 hodin. Následně byl vypočítán aritmetický průměr počtu kolonií, který byl poté přepočten na kolonie tvořící jednotky v 1 ml (CFU/ml) původního vzorku. [58]

### 6.2 Izolace a uchovávání mikroorganismů

Vybrané kolonie, které se na jednotlivých půdách lišily vzhledem, byly přeneseny vyžíhanou kličkou na příslušnou půdu (stejnou, na které byly izolovány z vína) a kultivovány za stejných podmínek. Izolované kolonie pak byly použity k další charakterizaci kmenů nebo byly zamrazeny pro další použití.

Vyrostlá kolonie byla přenesena do příslušného bujónu (Nutrient Broth, M17, AGA, AA, MRS) o objemu 5 ml a zkumavky inkubovány 24 hodin. Následně bylo asepticky přeneseno 0,7ml vyrostlé kultury do 0,7 ml 30% glycerolu. Vzorky byly uchovávány v eppendorfkových mikrozukmavkách při teplotě -70 °C.



### 6.3 Metody použité pro charakterizaci bakterií

Pro další charakterizaci bylo izolováno celkem 271 bakteriálních kmenů. Při charakterizaci bakterií izolovaných ze vzorků vín byly sledovány morfologické znaky a byly provedeny biochemické testy na dekarboxylázovou aktivitu.

Pro studium morfologických znaků bylo nutné získat na miskách jednotlivě izolované kolonie, a to pomocí křížového roztěru. [60] Misky byly kultivovány za stejných podmínek jako je uvedeno v kapitole 6.1.

Makroskopické morfologické znaky jsou patrné pouhým okem a ukazují, jak mikroorganismy rostou na živných půdách. Při vyhodnocování morfologie kolonií byl zjišťován vzhled kolonií, tvar, velikost a barva kolonií. [61]

Kromě makroskopických znaků byly pozorovány také znaky mikroskopické. U mikroskopické morfologie byl pozorován tvar a uspořádání buněk u barvených fixovaných preparátů. Připravený preparát byl pozorován pomocí mikroskopu za použití imerzního objektivu zvětšujícího 100x. [61]

### 6.4 Zjišťování produkce biogenních aminů v dekarboxylačním médiu

U všech 271 izolovaných kmenů byla zjišťována dekarboxylázová aktivita pomocí dekarboxylačního média s pH indikátorem. Za tímto účelem byly použity kultivační půdy obsahující prekurzor tvorby biogenního aminu, tj. aminokyselinu (arginin, ornitin, tyrozin, histidin nebo lyzin), a pH indikátor bromkresolovou červeň.

V případě zjišťování dekarboxylázové aktivity testovaných kmenů z půd PCA, AGA, AA bylo použito následující dekarboxylační médium:

#### *Složení dekarboxylačního média I*

Pepton (HiMedia)	0,33333 g
Yeast extrakt (HiMedia)	0,2 g
Bromkresolpurpur 0,2% v 50% alkoholu	0,66666 g
Příslušná L-aminokyselina (Sigma-Aldrich)	0,5 g
Destilovaná voda	100 ml
pH	5-5,3

Protože bakterie mléčného kvašení jsou kultivačně náročné a v tomto dekarboxylačním médiu by obtížně rostly, bylo v případě zjišťování dekarboxylázové aktivity testovaných

kmenů z půd M17, MRS a TJA použito dekarboxylační médium připravené dle Bover-Cid a Holzapfel. [62]

### *Složení dekarboxylačního média II*

Hodnoty jednotlivých komponent jsou uvedeny v gramech na 100 ml média:

Trypton (HiMedia)	0,5
Kvasničný extrakt (HiMedia)	0,5
Masový extrakt (HiMedia)	0,5
NaCl (Lach-Ner)	0,25
Glukóza (Lach-Ner)	0,05
Tween 80 (Sigma-Aldrich)	0,1
MgSO <sub>4</sub> (Lach-Ner)	0,02
MnSO <sub>4</sub> (Lach-Ner)	0,005
FeSO <sub>4</sub> (Lach-Ner)	0,004
Citrát amonný (Lach-Ner)	0,2
Thiamin (Sigma-Aldrich)	0,001
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (Lach-Ner)	0,2
CaCO <sub>3</sub> (Lach-Ner)	0,01
Piridoxal-5-fosfát (Sigma-Aldrich)	0,005
Příslušná aminokyselina (Sigma-Aldrich)	1,0
Bromkresol purpur (Sigma-Aldrich)	0,006
pH	5,3

Po úpravě pH byla média autoklávována v uzavřených lahvích (121 °C; 15 minut).

Produkce biogenních aminů byla sledována v mikrotitračních destičkách. Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo pipetováno 200 µl dekarboxylačního média obohaceného příslušnou aminokyselinou a 20 µl 24 hodinové suspenze daného mikroorganismu. Destičky byly přikryty víčkem a kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin a 48 hodin. Pozitivní reakce se projevovala změnou barvy média z oranžovohnědé na fialovou.

## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 7.1 Počty vyrostlých kolonií

Výsledky počtu vybraných skupin bakterií po 24 – 48 hodinové kultivaci při teplotě 30 °C jsou uvedeny v tabulkách a jsou vyjádřeny jako CFU v 1 ml vzorku. Počty kolonií na jednotlivých živných médiích jsou zaznamenány v *Tab. 8, 9 a 10*. Růst kolonií bakterií na jednotlivých půdách je patrný na *Obr. 2 a Obr. 3*.

*Tab. 8.* Počty vybraných skupin mikroorganismů izolovaných ze vzorků vína z vany 4 (výsledky uvedeny jako CFU/ml).

Číslo vzorku	Datum odběru	AGA	AA	MRS	TJA	PCA	M17
<b>1</b>	<b>27.10.2008</b>	692	1400	252	368	1220	826
<b>2</b>	<b>28.10.2008</b>	179	126	218	330	177	35
<b>3</b>	<b>29.10.2008</b>	221	252	60	533	592	383
<b>4</b>	<b>3.11.2008</b>	362	754	1	14	970	540
<b>5</b>	<b>4.11.2008</b>	391	408	8	0	510	1380
<b>6</b>	<b>5.11.2008</b>	26	340	9	4	349	490
<b>7</b>	<b>6.11.2008</b>	140	430	5	0	170	217
<b>8</b>	<b>7.11.2008</b>	120	330	2	0	190	284
<b>9</b>	<b>8.11.2008</b>	340	98	0	0	320	70
<b>10</b>	<b>10.11.2008</b>	51	> 5000	1	0	> 5000	> 5000
<b>11</b>	<b>11.11.2008</b>	16	37	5	8	43	20
<b>12</b>	<b>18.11.2008</b>	25	72	59	533	39	108
<b>13</b>	<b>28.11.2008</b>	6	18	0	0	27	14
<b>14</b>	<b>5.12.2008</b>	2	22	0	0	22	31
<b>15</b>	<b>6.1.2009</b>	58	28	0	0	22	28
<b>16</b>	<b>12.1.2009</b>	28	27	0	0	32	21
<b>17</b>	<b>27.1.2009</b>	20	28	0	0	113	17
<b>18</b>	<b>4.2.2009</b>	115	123	0	0	30	190

Bakterie byly izolovány na šesti živných médiích. Na půdě AGA byl největší nárůst kolonií zpočátku technologického procesu. Při teplotě 10 °C ve vaně bylo první den napočítáno 692 CFU/ml. Toto množství se rapidně snížilo hned následující den, kdy došlo k poklesu na 179 CFU/ml (současně byla teplota vany zvýšena na 12,4 °C). S rostoucí teplotou se toto množství následně mírně zvýšilo a pohybovalo se v rozmezí 200 – 400 CFU/ml. Po dosažení nejvyšší teploty 29,6 °C byl počet kolonií 391 CFU/ml. Poté teplota začala opět klesat a s ní i počet kolonií.

Na půdě AA byl při 10 °C taktéž značný nárůst kolonií a to 1400 CFU/ml. Toto množství se hned u následujícího vzorku snížilo, a to na 126 CFU/ml. Poté se ještě s rostoucí teplotou počet bakterií navýšil. I když teplota začala následně klesat, stále byl nárůst kolonií zhruba stejný, a to cca 400 CFU/ml. U vzorku číslo 11, který pocházel z 16. dne, kde byla dodržena teplota vany 21,8 °C, došlo k poklesu počtu kolonií na 37 CFU/ml. Zhruba v tomto rozmezí se počet kolonií pohyboval až do konce experimentu.

Na půdě MRS byl výchozí počet kolonií 252 CFU/ml. Tento počet s následujícími dny od výroby vína začal klesat. Od 33. dne až do konce výroby již nebyl pozorován žádný nárůst počtu kolonií. Podobný průběh byl sledován i na půdě TJA. Prvotní nárůst byl 368 CFU/ml, ihned následující den začal počet kolonií klesat a od 33. dne již nebyl zjištěn nárůst kolonií.

Na půdě PCA byl počet kolonií na počátku výroby 1220 CFU/ml, tento počet se následující den snížil. Poté došlo k navýšení počtu kolonií. Od vzorku číslo 11 (16. den, teplota 21,8 °C) byl počet snížen na 43 CFU/ml. Podobné počty kolonií byly zjištěny i u dalších vzorků vín. Obdobný průběh byl zjištěn i na půdě M17, kdy po počátečním dnu (826 CFU/ml) byl počet kolonií hned následující den snížen. Následovalo navyšování počtu kolonií až do 9. dne (maximální teplota 29,6 °C), kdy byl zjištěn nárůst 1390 CFU/ml. V následujících dnech s klesající teplotou započal i pokles nárůstu kolonií. Od vzorku číslo 11 (od 16. dne) až do konce experimentu byl počet CFU/ml jen v rozmezí několika desítek kolonií.

Na základě výsledků lze říci, že se zvyšující se teplotou se mikroflóra udržovala a narůstala až do dosažení maximální teploty. Po dosažení teplotního maxima již docházelo k úbytku počtu mikroorganismů, což mohlo být dáno méně vhodnými podmínkami v důsledku nižší teploty, vyčerpání živin a vzájemnými interakcemi mezi mikroorganismy.

Tab. 9 Počty vybraných skupin mikroorganismů izolovaných ze vzorků vína z vany 3 (výsledky uvedeny jako CFU/ml)

Číslo vzorku	Datum odběru	AGA	AA	MRS	TJA	PCA	M17
<b>19</b>	<b>27.10.2008</b>	161	189	0	0	167	160
<b>20</b>	<b>28.10.2008</b>	34	53	2	0	91	45
<b>21</b>	<b>29.10.2008</b>	61	56	2	1	51	51
<b>22</b>	<b>3.11.2008</b>	640	400	39	17	> 5000	1170
<b>23</b>	<b>4.11.2008</b>	168	217	0	0	270	210
<b>25</b>	<b>6.11.2008</b>	60	655	0	0	2174	237
<b>26</b>	<b>7.11.2008</b>	38	16	2	0	43	50
<b>27</b>	<b>8.11.2008</b>	38	50	0	0	113	17
<b>28</b>	<b>10.11.2008</b>	20	40	0	0	102	27
<b>29</b>	<b>11.11.2008</b>	6	10	0	0	40	2
<b>32</b>	<b>5.12.2008</b>	33	19	0	0	13	16
<b>33</b>	<b>6.1.2009</b>	4	11	0	0	26	14
<b>34</b>	<b>12.1.2009</b>	2	2	0	0	6	4
<b>35</b>	<b>27.1.2009</b>	4	32	0	0	162	44
<b>36</b>	<b>3.2.2009</b>	28	0	2	1	42	25

V případě vzorků získaných z další vany byl na půdě AGA zpočátku nízký počet kolonií, poté po dobu cca 2 týdnů se zvyšující se teplotou počet buněk narůstal (u vzorku číslo 22 odebraného po 1 týdnu bylo napočítáno 640 CFU/ml teplota 30 °C). Následující den se teplota začala snižovat a s ní i počet kolonií.

Na půdě AA byl zjištěn podobný průběh, 8. den při teplotě 30 °C byl rovněž značný nárůst kolonií a to 400 CFU/ml. Maxima bylo však dosaženo až při poklesu teploty na 21,2 °C (vzorek číslo 25 počet kolonií byl 655 CFU/ml). Další dny se snižující se teplotou už počet kolonií klesal. Při teplotě 7 °C, na konci technologického procesu už nebyl zjištěn žádný nárůst bakterií.

Na půdách MRS, TJA byl pozorován největší nárůst kolonií 8. den od počátku výrobního procesu při maximální teplotě technologického procesu 30 °C, a to u MRS 39 CFU/ml a TJA 17 CFU/ml. U většiny ostatních vzorků byl počet kolonií nulový (občas 1 až 2 kolonie).

Na půdách PCA a M17 byl zpočátku nízký počet kolonií, s rostoucí teplotou počet mikroorganismů narůstal, nejvyšší počet byl zjištěn při dosažení maximální teploty 30 °C 8. den u vzorku číslo 22. S klesající teplotou počty kolonií začaly klesat. (Tab. 9)

Výsledky ukazují, že s rostoucí teplotou docházelo k množení bakterií a k jejich rozvoji. Následné odumírání mikroflóry bylo pravděpodobně způsobeno vyčerpáním živin a postupně se zvyšující koncentrací alkoholu.

Tab. 10 Počty vybraných skupin mikroorganismů izolovaných ze vzorků vína z vany 5 (výsledky uvedeny jako CFU/ml)

Číslo vzorku	Datum odběru	AGA	AA	MRS	TJA	PCA	M17
37	3.11.2008	86	105	0	0	220	90
38	4.11.2008	168	201	0	0	156	153
39	4.11.2008	147	233	0	4	187	108
40	5.11.2008	103	600	0	0	140	380
41	6.11.2008	151	149	0	0	120	216
42	7.11.2008	109	81	31	2	163	58
43	8.11.2008	190	46	0	0	143	71
44	10.11.2008	133	150	0	0	195	78
45	11.11.2008	8	58	0	0	53	33
46	18.11.2008	34	27	3	0	12	13
47	28.11.2008	66	371	0	0	578	212
48	5.12.2008	61	44	0	0	29	50
49	6.1.2009	26	50	0	8	24	37
50	12.1.2009	6	8	1	0	2	10
52	4.2.2009	17	3320	0	0	N	1680

V další sadě vín byl na půdě AGA počet kolonií od počátku až do 8. dne (teplota 23,2 °C vzorek číslo 44) poměrně stálý, pohyboval se mezi 100 – 200 CFU/ml. Stejně jako u předcházejících sad i v tomto případě s rostoucí teplotou počet kolonií spíše vzrůstal. Od 9. dne při teplotě 21,9 °C a následujícím snižování teploty počet kolonií poklesl.

Na půdě AA se počet kolonií pohyboval od 105 až po 233 CFU/ml. Vysokého počtu bylo dosaženo 3. den při nejvyšší teplotě 31,7 °C, kdy byl počet kolonií 600 CFU/ml. Poté teplota začala klesat a s ní i počet kolonií. Na konci technologického procesu výroby počet kolonií vzrostl na maximum a to 3320 CFU/ml.

Na půdách MRS a TJA nebyl zjištěn téměř žádný nárůst kolonií. Pouze po 4 dnech od počátku výroby (vzorek číslo 42) byl počet kolonií na půdě MRS 31 CFU/ml.

Na půdě PCA se počáteční počet kolonií 220 CFU/ml s menšími výkyvy snižoval až do konce technologického procesu, kdy byl u vzorku číslo 52 pozorován maximální nárůst.

Na půdě M17 došlo ke zvýšení počtu kolonií z 90 CFU/ml na 380 CFU/ml při maximální teplotě 31,7 °C (3. den; vzorek číslo 40). Toto množství se začalo opět snižovat a nejvíce

kolonií bylo napočítáno opět na konci experimentu u vzorku číslo 52. Zde bylo napočítáno 1680 CFU/ml.

U vzorků vína odebraných z vany 5, které byly, na rozdíl od předcházejících 2 sad vzorků, zaočkovány jinou kulturou mikroorganismů, byla opět pozorována tendence vysokého výskytu mikroorganismů při vyšší teplotě (Tab. 10). Na rozdíl od předchozích vzorků byl v této sadě pozorován výskyt mikroorganismů i na konci technologického procesu, a to zejména na půdě AA, na které se dá předpokládat výskyt zejména bakterií octového kvašení. Ty mají na víno negativní vliv a jsou nežádoucími. Je možné, že k jejich rozvoji došlo díky tomu, že víno se dostalo do kontaktu s kyslíkem. Další z možných příčin zvýšeného výskytu těchto bakterií je, že mošt nebyl zasířen, což taky podporuje výskyt těchto bakterií. Růst různých mikroorganismů ve víně ovlivňují zejména teplota, množství alkoholu, oxidačně redukční prostředí a stupeň kyselosti vína. Během výroby vína dochází k sérii kompletních mikrobiologických přeměn, které uskutečňují kvasinky, bakterie a plísně. Na výrobě vína se zpravidla podílí jen kvasinky a bakterie mléčného kvašení. Plísně a bakterie octového kvašení jsou z moštu vypuzeny, jakmile jsou hrozny přelity do fermentační nádrže. Kvasinky jsou lépe přizpůsobeny pro růst v hroznovém moštu, jsou schopny se přizpůsobit vyšší koncentraci cukru i nízkému pH 3,0 – 3,3. [10] Díky těmto vlastnostem kvasinek začíná jako první alkoholové kvašení. Poté následuje jablečno-mléčné kvašení, způsobené bakteriemi mléčného kvašení. Již v průběhu alkoholového kvašení dochází k zvyšování počtu BMK. [1, 10] Nejčastějšími druhy, které bývají izolovány z vína jsou *Lactobacillus casei*, *Lb. plantarum* a v menší míře *Oenococcus oeni* nebo *Pediococcus cerevisiae*. Tyto druhy se zpravidla nemnoží a odumírají v průběhu kvašení. Po dokončení alkoholového kvašení byla vína zaočkována startérovými kulturami, aby se spustilo jablečno-mléčné kvašení. Pro snadný průběh jablečno-mléčného kvašení musí být podmínky následující: hodnota pH vyšší než 3,2, volný SO<sub>2</sub> pod 10 mg/l, teplota vyšší než 18 °C, alkoholu méně než 13%. [23, 25] Z výsledků vyplývá, že opravdu docházelo k rozvoji bakterií až do maximální teploty technologického procesu. Poté došlo k úbytku počtu mikroorganismů což, mohlo být způsobeno již vyšší koncentrací alkoholu, vyčerpáním živin, zasířením vína.

V dalším experimentu byla provedena mikrobiologická analýza červených vín (vzorek X1 – X21 Cabernet, vzorek X22 – X42 Zweigeltrebe) získaných od soukromého vinaře. Polovina vzorků byla vždy uměle zaočkována kulturou BioStart<sup>®</sup> Forte SK2, která obsahovala

kmen *Oenococcus oeni*, a byl sledován vliv zaočkování na počet jednotlivých skupin bakterií ve víně. *Tab. 11.*

*Tab. 11.* Počty vybraných skupin mikroorganismů izolovaných ze vzorků vína získaných od prvního vinaře (výsledky uváděny jako CFU/ml).

Č. vzorku	Datum odběru	Druh vína	AGA	AA	MRS	TJA	PCA	M17
X1	7.12.	C očkování	0	2	0	0	0	0
X2	10.12.	C zaočkované	2	2	0	0	2	2
X3	13.12.	C zaočkované	0	0	0	0	2	6
X4	16.12.	C zaočkované	0	2	0	0	0	0
X5	19.12.	C zaočkované	4	6	0	0	2	0
X6	21.12.	C zaočkované	0	0	0	0	0	0
X7	23.12.	C zaočkované	817	760	0	62	2600	372
X8	27.12.	C zaočkované	0	0	0	0	0	0
X9	30.12.	C zaočkované	0	0	0	0	7	10
X10	3.1.	C zaočkované	0	0	0	0	0	0
X11	7.1.	C zaočkované	18	22	0	0	12	9
X12	10.12.	C kontrola	0	0	0	0	0	0
X13	13.12.	C kontrola	0	0	0	0	0	0
X14	16.12.	C kontrola	0	2	0	0	0	0
X15	19.12.	C kontrola	0	0	0	0	0	0
X16	21.12.	C kontrola	66	90	0	0	480	> 5000
X17	23.12.	C kontrola	0	0	0	0	0	0
X18	27.12.	C kontrola	1	18	0	0	95	134
X19	30.12.	C kontrola	114	5	0	0	2	4
X20	3.1.	C kontrola	0	0	0	0	0	0
X21	7.1.	C kontrola	0	0	0	0	0	0
X22	7.12.	Z očkování	94	87	0	0	0	248
X23	10.12.	Z zaočkované	0	0	0	0	0	0
X24	13.12.	Z zaočkované	0	0	0	0	0	1
X25	16.12.	Z zaočkované	0	> 5000	0	0	> 5000	> 5000
X26	19.12.	Z zaočkované	92	102	165	0	124	176
X27	21.12.	Z zaočkované	0	4	0	0	0	0
X28	23.12.	Z zaočkované	18	1	0	0	0	0
X29	27.12.	Z zaočkované	> 5000	> 5000	0	0	> 5000	164
X30	30.12.	Z zaočkované	0	0	0	0	1	0
X31	3.1.	Z zaočkované	0	24	0	0	5	32
X32	7.1.	Z zaočkované	151	204	0	0	> 5000	110
X33	10.12.	Z kontrola	> 5000	332	0	0	178	252
X34	13.12.	Z kontrola	0	0	0	0	0	0
X35	16.12.	Z kontrola	0	16	0	0	0	252



Pokračování Tab. 11

Č. vzorku	Datum odběru	Druh vína	AGA	AA	MRS	TJA	PCA	M17
X36	19.12.	Z kontrola	0	0	0	0	> 5000	0
X37	21.12.	Z kontrola	1	3	0	0	0	0
X38	23.12.	Z kontrola	0	3	0	0	0	0
X39	27.12.	Z kontrola	0	0	0	0	0	0
X40	30.12.	Z kontrola	2	3	0	0	0	5
X41	3.1.	Z kontrola	0	0	0	0	0	0
X42	7.1.	Z kontrola	0	0	0	0	0	0

\* C – Cabernet Moravia, Z – Zweigeltrebe.

Víno Cabernet Moravia bylo první den zaočkováno kulturou oenokoků, nebyl však pozorován téměř žádný nárůst kolonií bakterií až do vzorku číslo 7 odebraného po 14 dnech od zaočkování, kdy došlo ke zvýšení počtu kolonií na půdách AGA (817 CFU/ml), AA (760 CFU/ml), TJA (62 CFU/ml), PCA (260 CFU/ml) a M17 (372 CFU/ml). Tato množství však hned u dalšího vzorku číslo 8, odebraného po 4 dnech klesla k 0. Poté byl u vzorků vín zaočkovaných kulturou BioStart® Forte SK2 zjištěn nárůst bakterií jen ojediněle. U kontrolních vzorků vína Cabernet, které nebyly zaočkovány (vzorky X12-X21), byl pozorován občasný nárůst kolonií. Na půdě AGA byl nejvyšší počet kolonií 114 CFU/ml 53. den (vzorek číslo X19), 44. den na půdě AA 90 CFU/ml (vzorek číslo X16), půda TJA byla zcela bez nárůstu, a to i přesto, že je určena pro bakterie *Oenococcus*, kterými byla vína zaočkována. Na PCA bylo maximum 480 CFU/ml (vzorek číslo X16, stejně jako u půdy M17). Na půdě MRS nebyl pozorován žádný nárůst kolonií u zaočkovaných ani u kontrolních vzorků. Dalo by se předpokládat, že počet kolonií bude vyšší u zaočkovaných vzorků, z výsledků je však patrné, že větší množství mikroorganismů se vyskytovalo u vzorků kontrolních. Je možné, že zaočkováním došlo k vzájemnému potlačení mikroflóry. Navíc bakterie *Oenococcus* jsou kultivačně náročné a je poměrně obtížné je zachytit i na selektivní půdě TJA nebo na dalších půdách pro mléčné koky (např. M17).

U vína Zweigeltrebe proběhlo očkování kulturou BioStart® Forte SK2 7. prosince (vzorek číslo X22). Na půdě AGA byl počet kolonií 94 CFU/ml a na půdě AA 87 CFU/ml. Půdy MRS, TJA a PCA byly bez nárůstu. Na půdě M17 byl počet 248 CFU/ml. Následující dny odběru na půdě AGA byl nárůst nulový (vzorky číslo X23, X24, X25). U vzorku číslo X26

vzrostl počet kolonií na 92 CFU/ml. Při dalším odběru nebyl opět zjištěn nárůst. U vzorku číslo 28 bylo napočítáno 18 CFU/ml a u vzorku X29 dokonce > 5000 kolonií. Vzorky číslo X30 a X31 byly opět bez nárůstu. U vzorků pocházejících z posledního dne odběru bylo napočítáno 151 CFU/ml. Podobný průběh byl zaznamenán i na půdě AA. Na půdě MRS byl nárůst kolonií pouze u vzorku číslo X26 a to 165 CFU/ml. Na půdě TJA opět nebyl zjištěn nárůst. Na půdě PCA bylo > 5000 kolonií u vzorků číslo X25, X29, X32. U vzorku číslo X26 bylo 124 CFU/ml, u vzorku X30 vyrostla 1 kolonie a 5 kolonií u vzorku X31. U zbylých vzorků nebyl na půdě PCA pozorován žádný nárůst. Na půdě M17 došlo v prvních dnech ke snížení počtu kolonií, poté se počet bakterií opět zvýšil (176 CFU/ml u vzorku 26). U vzorku X29 bylo napočítáno 164 CFU/ml. Poslední den odběru bylo výsledné množství 110 CFU/ml. U kontrolního vzorku číslo X33 byl počet na AGA > 5000, na půdě AA 332 CFU/ml, půda PCA 178 CFU/ml a na M17 252 CFU/ml. Počet bakterií se u kontrolních vzorků vín během dalších dnů snižoval. V převážné většině nebyl zjištěn nárůst.

Z výsledků vyplývá, že u vína Cabernet Moravia byly vhodnější podmínky pro růst mikroorganismů u vín nezaočkovaných, u vína Zweigeltrebe tomu bylo naopak.

Od druhého soukromého vinaře pocházely další vzorky vín (vzorek X43 – X63 Zweigeltrebe a vzorek X64 – X84 Cabernet). Polovina vzorků byla vždy uměle zaočkována stejnou kulturou jako v případě prvního vinaře a byl sledován vliv zaočkování na mikrobiologickou kvalitu vína. *Tab. 12.*

*Tab. 12* Počty vybraných skupin mikroorganismů izolovaných ze vzorků vína získaných od druhého vinaře (výsledky uvedeny jako CFU/ml).

Č. vzorku	Datum oděru	Druh vína	AGA	AA	MRS	TJA	PCA	M17
X43	27.10.	Z očkování	2	0	0	0	0	0
X44	10.11.	Z kontrola	1	292	48	0	0	0
X45	24.11.	Z kontrola	144	> 5000	0	0	0	> 5000
X46	8.12.	Z kontrola	0	0	0	0	0	0
X47	22.12.	Z kontrola	1	1	0	0	1	1
X48	5.1.	Z kontrola	0	0	0	0	0	0
X49	19.1.	Z kontrola	0	0	0	0	0	0
X50	2.2.	Z kontrola	0	0	0	0	0	0
X51	16.2.	Z kontrola	0	2	0	0	0	0
X52	2.3.	Z kontrola	0	0	0	0	2	2
X53	16.3.	Z kontrola	0	0	0	0	0	0
X54	10.11.	Z zaočkované	0	0	0	0	0	0

Pokračování Tab. 12

Č. vzorku	Datum oděru	Druh vína	AGA	AA	MRS	TJA	PCA	M17
X55	24.11.	Z zaočkované	0	0	0	0	0	0
X56	8.12.	Z zaočkované	0	0	0	0	0	1
X57	22.12.	Z zaočkované	0	31	0	0	0	0
X58	5.1.	Z zaočkované	4	1	0	0	0	0
X59	19.1.	Z zaočkované	0	0	0	0	0	0
X60	2.2.	Z zaočkované	0	2	0	0	0	0
X61	16.2.	Z zaočkované	0	2	0	0	0	0
X62	2.3.	Z zaočkované	0	2	0	0	0	2
X63	16.3.	Z zaočkované	6	12	0	0	0	24
X64	24.11.	C očkování	0	0	0	0	0	0
X65	8.12.	C kontrola	0	6	0	0	0	0
X66	22.12.	C kontrola	0	0	0	0	0	0
X67	5.1.	C kontrola	1	0	0	0	0	0
X68	19.1.	C kontrola	0	1	0	0	0	0
X69	2.2.	C kontrola	0	0	0	0	0	2
X70	16.2.	C kontrola	0	6	0	0	2	2
X71	2.3.	C kontrola	0	4	0	0	2	0
X72	16.3.	C kontrola	0	0	2	0	0	0
X73	30.3.	C kontrola	0	18	0	0	2	2
X74	13.4.	C kontrola	0	0	0	0	0	6
X75	8.12.	C zaočkované	0	0	0	0	0	0
X76	22.12.	C zaočkované	0	0	0	0	0	0
X77	5.1.	C zaočkované	0	0	0	0	0	0
X78	19.1.	C zaočkované	0	0	0	0	0	0
X79	2.2.	C zaočkované	0	0	0	0	0	4
X80	16.2.	C zaočkované	0	0	0	0	0	2
X81	2.3.	C zaočkované	0	0	0	0	0	2
X82	16.3.	C zaočkované	0	4	0	0	0	0
X83	30.3.	C zaočkované	0	0	0	0	0	0
X84	13.4.	C zaočkované	0	2	0	0	0	4

\* C – Cabernet Moravia, Z – Zweigeltrebe.

V případě vína Zweigeltrebe od druhého vinaře byl po zaočkování kulturou podporující jablečno-mléčné kvašení sledován nárůst kolonií pouze na půdě AGA a to 2 CFU/ml u zbylých živných médií byl nárůst nulový. Nulový počet kolonií byl až na výjimky (vzorky X57 a X63) zjištěn u všech zaočkovaných vzorků. U vzorků kontrolních byl sledován nárůst na půdách AA a MRS po 2 týdnech od začátku výroby (vzorek X44; AA 292 CFU/ml, MRS 48 CFU/ml). Na ostatních půdách růst nebyl pozorován. Při dalším odběru po 14

dnech (vzorek číslo X45) se tyto počty změnilý následovně, na půdě AGA došlo k nárůstu na množství 144 CFU/ml, na půdách AA a M17 k nárůstu > 5000 kolonií. Další dny odběru již nedocházelo k navyšování počtu kolonií. Na všech živných médiích nárůst poklesl a byl většinou nulový. U zaočkovaného vína Zweigeltrebe se mikroflóre příliš nedařilo.

U vína Cabernet v den očkování nebyl pozorován na žádném živném médiu nárůst kolonií, k žádnému výraznějšímu rozvoji mikroorganismů nedošlo ani při dalších odběrech. U kontrolních vzorků nebyl zaznamenán taktéž žádný zvýšený počet kolonií.

U druhé sady vín se mikroorganismům příliš nedařilo. Je možné, že tyto výsledky jsou ovlivněny stářím vína a mohlo tak dojít k postupnému odumírání životaschopných mikroorganismů. Na nízký počet bakterií mohlo mít vliv i zasaření, příliš vysoká koncentrace alkoholu či vzájemné interakce mezi jednotlivými mikroorganismy. Výsledky mohly být také ovlivněny tím, z které části vany byly vzorky odebrány, zda ze spodní, prostřední či z povrchové vrstvy.

*Obr. 2. Ukázka růstu kolonií izolovaných ze vzorků vín na půdách TJA, AGA a MRS*



Vzorek vína číslo 4 na půdě TJA, vzorek vína číslo 1 na půdě AGA a na půdě MRS.

*Obr. 3. Ukázka růstu kolonií izolovaných ze vzorků vín na půdách M17, AA a PCA*



Vzorek vína číslo 19 na půdě M17, vzorek číslo 7 z druhé sady vín na půdě AA a na půdě PCA.

## 7.2 Charakterizace izolovaných bakterií

Odlišné kolonie bakterií vyrostených na jednotlivých půdách byly izolovány pomocí křížového roztěru a následně byly charakterizovány pomocí makroskopických a mikroskopických morfologických znaků. Celkem bylo izolováno 86 kmenů z půdy M17, 3 kmeny z půdy TJA, 61 kmenů bakterií z PCA, 71 kmenů z půdy AA, 41 kmenů z AGA a 9 kmenů z půdy MRS. Výsledky jsou uvedeny v následujících tabulkách 13 - 17. Vzorky označené (X1, X2 ... ) značí vzorky vín z druhé řady od prvního a druhého vinaře. Ukázka růstu čistých kultur bakterií izolovaných z vín je na *Obr. 4* a *Obr. 5*.

Z půdy PCA bylo připraveno k další charakterizaci 61 izolátů. Jako gramnegativní bylo označeno 42 kmenů, zbylých 19 izolátů bylo grampozitivních. Kolonie byly převážně menší, bílé, vanilkové, někdy s nádechem oranžové. Pod mikroskopem se jako tyčinky jeví 40 kmenů, v naprosté většině se jednalo o shluky, často formované do řetízků. U čtyř izolátů (7, 8, 9, 45) se tyčinky vyskytovaly převážně ve dvojicích nebo samostatně. Jako koky bylo vyhodnoceno 20 kmenů, opět vyskytujících se v nepravidelných shlucích (stafylokoky) nebo tvořících tetrády. Koky vyskytující se jednotlivě, popřípadě ve dvojicích nebo trojicích, byly pozorovány u tří kmenů. Jeden izolát (44) byl označen jako kokotyčinky v nepravidelných shlucích. Podrobnější morfologické charakteristiky všech 61 izolátů z půdy PCA jsou uvedeny v *Tab. 13*.

*Tab. 13* Morfologické znaky kmenů izolovaných z půdy PCA.

Kód izolátu	Vzorek vína	Gramova reakce	Vzhled kolonií	Mikroskopické znaky
1	16	G-	nepravidelné, kulaté, vanilkové, matné, plazivý růst	malé tyčinky, řetízky, dvojice
2	16	G-	nepravidelné, kulaté, vanilkové, matné, plazivý růst	malé tyčinky, řetízky, dvojice
3	49	G-	nepravidelné, kulaté, bílé, matné, plazivý růst	tyčinky, shluky, řetízky
4	10	G-	nepravidelné, kulaté, bílé, matné, plazivý růst	tyčinky, shluky, řetízky
5	10	G-	kulaté, vanilkové, lesklé	tyčinky, vedle sebe, řetízky, dvojice
6	25	G-	kulaté, vanilkové	koky, shluky, tetrády, stafylokoky
7	47	G-	kulaté, vanilkové, lesklé, plazivý růst	tyčinky, dvojice, samostatně
8	47	G-	kulaté, vanilkové, lesklé, plazivý růst	tyčinky, dvojice, samostatně

Pokračování Tab. 13

Kód izolátu	Vzorek vína	Gramova reakce	Vzhled kolonií	Mikroskopické znaky
9	13	G+	malé, kulaté, mléčné	tyčinky, hlavně samostatně, dvojice
10	13	G-	malé, kulaté, nádech žluté	koky, nepravidelné shluky
11	1	G-	kulaté, vanilkové, plazivý růst	tyčinky, shluky, řetízky
12	28	G-	kulaté, vanilkové, plazivý růst	tyčinky, shluky, řetízky
13	9	G-	nepravidelně kulaté, vanilkové, matné, plazivý růst	malé tyčinky, řetízky, dvojice
14	15	G-	malé, kulaté, průsvitné	tyčinky, dvojice, vedle sebe
15	19	G+	malé, kulaté, do červena	koky, shluky
16	21	G+	oválné, žluté	menší tyčinky, shluky, dvojice
17	7	G-	nepravidelně kulaté, vanilkové, matné, plazivý růst	malé tyčinky, řetízky, dvojice
18	7	G-	nepravidelně kulaté, bílé, matné, plazivý růst	tyčinky, shluky, řetízky
19	11	G-	větší, kulaté, mléčné, lesklé	tyčinky, nepravidelné shluky
20	11	G-	nepravidelné, kulaté, vanilkové, matné, plazivý růst	malé tyčinky, řetízky, dvojice
21	12	G-	nepravidelné, kulaté, vanilkové, matné, plazivý růst	malé tyčinky, řetízky, dvojice
22	12	G-	nepravidelně kulaté, vanilkové, matné, plazivý růst	malé tyčinky, řetízky, dvojice
23	41	G+	velké, kulaté, vanilkové	tyčinky, propletené řetízky
24	41	G+	menší, vroubkovaný okraj, našedlé	koky, nepravidelné shluky
25	41	G-	kulaté, nádech žluté	tyčinky, řetízky
26	34	G-	kulaté, vanilkové, nádech hnědé, lesklé	krátké tyčinky, nepravidelné shluky
27	42	G+	malé, kulaté, mléčné	tyčinky, řetízky, shluky
28	42	G-	malé kulaté, žlutohnědé	tyčinky, dvojice, řetízky
29	8	G+	malé, kulaté, vanilkové s nádechem hnědé	koky, nepravidelné shluky
30	8	G+	světle vanilkové, střed tmavší	krátké tyčinky, řetízky
32	27	G+	malé, kulaté, oranžovohnědé	koky, nepravidelné shluky, hrozny
33	27	G+	malé, kulaté, nahnědlé	malé koky, samostatně, dvojice, trojice
34	27	G+	kulaté, tmavě vanilkové	koky, nepravidelné shluky
35	27	G-	nepravidelné, kulaté, vanilkové, matné, plazivý růst	malé tyčinky, řetízky, dvojice

Pokračování Tab. 13

Kód izolátu	Vzorek vína	Gramova reakce	Vzhled kolonií	Mikroskopické znaky
36	17	G+	kulaté, bílé	koky, nepravidelné shluky
37	17	G-	malé, kulaté, oranžovohnědé	koky, nepravidelné shluky
38	33	G+	kulaté, našedlé, matné	krátké tyčinky, shluky, samostatně
39	6	G-	kulaté, vroubkovaný okraj, bílé	koky, shluky, řetízky
40	3	G+	kulaté, oranžovohnědé	koky, nepravidelné shluky
41	3	G-	kulaté, vroubkovaný okraj, bílé	tyčinky, dvojice, shluky, s myceliem
42	5	G-	nepravidelné, kulaté, bílé, matné, plazivý růst	tyčinky, shluky, řetízky, vedle sebe
43	5	G-	nepravidelné, kulaté, bílé, matné, plazivý růst	tyčinky, shluky, řetízky, vedle sebe
44	39	G+	kulaté, našedlé, střed tmavší	kokotyčinky, nepravidelné shluky
45	39	G-	kulaté, bílé, matné	tyčinky, dvojice, samostatně
46	39	G-	kulaté, nádech hnědé, střed tmavší	krátké tyčinky, shluky
47	36	G-	kulaté, nádech hnědé, střed tmavší	krátké tyčinky, shluky
48	36	G+	malé, kulaté, bílé	malé koky, samostatně, dvojice
49	X7	G-	kulaté, bílé, nádech hnědé	koky, nepravidelné shluky
50	X7	G+	oválné, žluté	menší tyčinky, shluky, dvojice, řetízky
51	X11	G-	kulaté, vroubkovaný okraj, bílé	koky, nepravidelné shluky
52	X9	G-	kulaté, vroubkovaný okraj, bílé	koky, nepravidelné shluky
146	X2	G-	větší, kulaté, mléčné, lesklé	tyčinky, nepravidelné shluky
147	19	G-	malé, kulaté, průsvitné	tyčinky, dvojice, shluky
149	44	G+	malé kulaté, nahnědlé	malé koky, samostatně, dvojice, trojice
202	X16	G-	kulaté, vanilkové	koky, shluky, tetrády, stafylokoky
204	X30	G-	kulaté, malé, bílé	tyčinky, řetízky, dvojice
205	X31	G-	malé, kulaté, oranžovohnědé	koky, nepravidelné shluky
247	X37	G-	kulaté, vroubkovaný okraj, vanilkové	koky, řetízky, řetízky
248	X70	G-	malé, kulaté, průsvitné	tyčinky, dvojice, shluky
249	X52	G-	malé, kulaté, průsvitné	tyčinky, dvojice, shluky
250	X71	G+	kulaté, matné, červenohnědé, střed tmavší	tyčinky, shluky

Na půdě M17 bylo izolováno 86 kmenů bakterií, z nichž bylo 59 gram pozitivních. Více než polovina (celkem 54 izolátů) se pod mikroskopem jevila jako tyčinky, většinou ve shlucích nebo formované do řetízků, vedle sebe nebo ve dvojicích. 28 izolátů byly koky ve shlucích. Zbýlých 7 kmenů bylo klasifikováno jako kotyčinky. Podrobnější morfologie všech uvedených izolátů je uvedena v *Tab. 14*.

*Tab. 14* Morfologické znaky kmenů izolovaných z půdy M17

Kód izolátu	Vzorek vína	Gramova reakce	Vzhled kolonií	Mikroskopické znaky
56	15	G+	větší, nepravidelně kulaté, mírně nahnědlé	tyčinky v nepravidelných shlucích
57	28	G+	menší, kulaté, lesklé, hnědožluté	koky, shluky
58	28	G+	malé, kulaté, vanilkové	koky, shluky hrozny
59	23	G+	bílé kulaté	tyčinky ve dvojici, v řetízcích
60	23	G+	bílé kulaté, světlá zóna v okolí kolonií	kokotyčinky, shluky
61	10	G+	malé, bílé, kulaté	koky, shluky
62	38	G+	drsne, kulaté, mírně do hněda	tyčinky, dvojice řetízky
63	12	G+	bílošedé kulaté	tyčinky, samostatně i shluky
64	12	G-	malé, nepravidelné, slizké, mírně do hněda	koky, shluky
65	11	G-	kulaté, bílé se šedou zónou kolem kolonií	tyčinky, řetízky
66	17	G+	malinké, bílé, kulaté	koky, hrozny
67	17	G+	malé, kulaté, bílé	koky, hrozny
68	39	G-	nepravidelně kulaté, matné, střed bělejší, šedá zóna kolem kolonií	tyčinky, vedle sebe, řetízky
69	39	G+	kulaté, šedé, plazivý růst	tyčinky dlouhé spojené do řetízků
70	22	G+	kulaté, matné, šedivé	tyčinky, podlouhlé, do řetízků
71	22	G+	kulaté, našedivělé, plazivý růst	tyčinky, převaha dvojic
72	34	G+	kulaté, bílé s nádechem oranžové, plazivý růst	tyčinky, převaha dvojic
73	36	G+	kulaté, drsné, šedivé, plazivý růst	tyčinky, některé zakřivené
74	27	G+	malé, kulaté, šedé	tyčinky, řetízky
75	3	G+	kulaté, matné, šedivé	tyčinky, vedle sebe, řetízky



Pokračování Tab. 14

Kód izolátu	Vzorek vína	Gramova reakce	Vzhled kolonií	Mikroskopické znaky
76	19	G-	menší, kulaté, mírně nažloutlé	tyčinky, samostatně, shluky
77	40	G-	kulaté, bílé, šedá zóna kolem kolonií	tyčinky, dlouhé, řetízky
78	40	G+	kulaté, bílé, šedá zóna kolem kolonií	tyčinky, krátké, řetízky
79	13	G-	nepravidelně kulaté, nahnědlé, plazivý růst	tyčinky, dvojice, samostatně, řetízky
80	4	G-	kulaté, našedlé, plazivý růst	tyčinky, dvojice
81	20	G+	nepravidelně kulaté, bílé, šedá zóna kolem kolonií	kokotyčinky
82	43	G+	kulaté, matné, šedivé	koky, shluky
83	47	G-	nepravidelně kulaté hnědošedé	tyčinky, shluky
84	47	G-	malé, kulaté, nažloutlé	tyčinky, řetízky, dvojice, trojice
85	49	G+	kulaté, bílé, matné, plazivý růst	tyčinky, dvojice
86	49	G-	kulaté, oranžovožluté, matné	koky, shluky
87	52	G+	bílé, kulaté, šedá zóna kolem kolonií	shluky koků
88	35	G+	malé, kulaté, nažloutlé	koky, hrozny
89	25	G-	kulaté, bílé, šedá zóna kolem kolonií	koky, samostatně po čtyřech, hrozny
90	10	G-	kulaté, šedé, matné, plazivý růst	tyčinky, nepravidelné shluky
91	45	G+	matné, vanilkové, plazivý růst	tyčinky, vedle sebe
92	45	G+	kulaté, bílé, zóna kolem kolonií	kokotyčinky
93	9	G-	kulaté, nažloutlé, plazivý růst	tyčinky, dlouhé, řetízky
94	43	G+	kulaté, lesklé, bílé	tyčinky s myceliem, shluky
95	32	G+	drsňé, nepravidelný tvar, bílé	tyčinky, dvojice
96	50	G-	nepravidelné, matné, mírně do hněda	tyčinky, nepravidelné shluky
97	41	G-	malé, kulaté, bílé s hnědší zónou kolem kolonií	tyčinky, řetízky, řetízky s myceliem

Pokračování Tab. 14

Kód izolátu	Vzorek vína	Gramova reakce	Vzhled kolonií	Mikroskopické znaky
98	8	G+	drsne, nepravidelný tvar, bílé	malé tyčinky, řetízky, do V
99	5	G+	matné, kulaté, mírně nahnědlé	tyčinky, dvojice, shluky
100	37	G+	kulaté, bílé, plazivý růst	tyčinky, trojice a více
101	16	G+	kulaté, menší, šedivé	tyčinky, nepravidelné shluky
102	16	G+	kulaté, mírně šedé	koky, spojené do tetrad, hroznů
103	18	G+	bílé, kulaté	tyčinky jednotlivě, i ve shlucích
104	48	G-	menší, bílé kulaté	tyčinky, samostatně i ve shlucích
105	26	G+	větší kulaté, šedé, matné	tyčinky shluky
106	X3	G+	drsne, nepravidelně kulaté, bílé	kokotyčinky, samostatně
107	X7	G+	kulaté, šedivé, plazivý růst	koky, shluky
108	X2	G+	matné, kulaté, bílé, šedá zóna kolem kolonií	tyčinky, shluky samostatně
109	X11	G+	oválné, bílé, šedá zóna kolem kolonií, plazivý růst	tyčinky řetízky
110	4 TJA	G-	malé kulaté, šedobílé	tyčinky, samostatně, dvojice
111	1 TJA	G-	kulaté, bílé, šedá zóna kolem kolonií	dlouhé tyčinky, spojené do řetízků
112	3 TJA	G-	drsne, nepravidelně kulaté, bíložluté	tyčinky mycelium
150	21	G-	kulaté, nažloutlé, plazivý růst	tyčinky, samostatně, dvojice
151	14	G-	větší, kulaté, matné, vanilkové	tyčinky, nepravidelné shluky
156	7	G+	kulaté, průsvitné, lesklé	tyčinky shluky, samostatně
207	X29	G+	malé, kulaté, bílé	koky, uspořádané do hroznů
208	X19	G-	malé, kulaté, bílé	tyčinky, dvojice, do V
209	X33	G-	kulaté, malé, bílé	koky, hrozny
210	X31	G+	kulaté, malé, nažloutlé	koky, po čtyřech
211	X26	G+	malé, kulaté, bílé	koky, nepravidelné shluky
212	X22	G+	menší, kulaté, lesklé, bílé	koky, nepravidelné shluky

Pokračování Tab. 14

Kód izolátu	Vzorek vína	Gramova reakce	Vzhled kolonií	Mikroskopické znaky
213	X24	G-	kulaté, menší, šedivé, plazivý růst	koky, samostatně i shluky
214	X32	G+	kulaté, malé, žluté	koky, shluky
215	X35	G+	malé, kulaté, světle žluté	koky, shluky
216	X18	G-	malé, kulaté, mírně nažloutlé	koky, tetrády, sarcíny
217	X16	G+	nepravidelně kulaté, drsné, bílé	tyčinky, samostatně, řetízky
218	X16	G+	malé, kulaté, bílé	koky, shluky
240	X47	G-	kulaté průsvitné, mírně do šeda	tyčinky s myceliem
241	X45	G+	malé, kulaté, nažloutlé	koky, hrozny, tetrády
242	X56	G+	kulaté, našedivělé, plazivý růst	tyčinky, hlavně samostatně, někdy dvojice
243	X40	G+	nepravidelný tvar, drsné, šedivé	kokotyčinky
251	X74	G+	malé, kulaté, lesklé, šedobílé	kokotyčinky
252	X80	G+	nepravidelně kulaté, vypouklé, vanilkové, plazivý růst	tyčinky, zakřivené, dvojice, trojice
253	X69	G-	oválné, lesklé, slizké, do hněda až červena, plazivý růst	tyčinky ve dvojicích
254	X79	G+	malé, kulaté, nažloutlé	koky, shluky
255	X79	G-	kulaté, šedivé, plazivý růst	tyčinky, řetízky
256	X73	G-	kulaté, vanilkové, slizké, plazivý růst	tyčinky, dvojice, řetízky
257	X52	G+	malé, kulaté, bíložluté	koky, hrozny
258	X70	G+	kulaté, lesklé, oranžovohnědé	koky, nepravidelné shluky
259	X62	G-	kulaté, malé, lesklé bílé	koky, nepravidelné shluky
260	X84	G+	malé, kulaté, našedlé	tyčinky, samostatně, dvojice
261	X81	G+	malinké, kulaté, průsvitné	kokotyčinky
262	X84	G+	oválné, naoranžovělé, plazivý růst	tyčinky, shluky
263	X63	G+	vanilkové, šedá zóna kolem kolonií	tyčinky, řetízky s myceliem

Z půdy AA bylo izolováno a charakterizováno 71 kmenů, z nichž bylo 38 izolátů grampozitivních. Opět převládaly kolonie světlé barvy (bílé, vanilkové, nažloutlé). Pod mikroskopem se jako tyčinky jeví 43 kmenů bakterií, které nejčastěji tvořily nepravidelné shluky. 21 izolátů byly shluky koků. Zbýlých 7 kmenů byly kokotyčinky, z nich se 3 vyskytovaly ve shlucích, 2 samostatně nebo ve dvojicích a u dvou izolátů byly kokotyčinky formovány do řetízků. Podrobnější morfologická charakteristika všech kmenů je uvedena v *Tab. 15*.

*Tab. 15* Morfologické znaky kmenů izolovaných z půdy AA.

Kód izolátu	Vzorek vína	Gramova reakce	Vzhled kolonií	Mikroskopické znaky
113	33	G+	nepravidelně kulaté, světle vanilkové	krátké tyčinky, dvojice, řetízky
114	33	G+	matné, bílé až naředlé, plazivý růst	tyčinky, nepravidelné shluky
115	X1	G+	malé, kulaté, bílé	kokotyčinky, samostatně, dvojice
116	X14	G+	matné, bílé až naředlé, plazivý růst	tyčinky, nepravidelné shluky
117	X7	G+	nepravidelně kulaté, menší, vanilkové	krátké tyčinky, shluky
118	X5	G-	kulaté, větší, nahnědlé	kokotyčinky, shluky
119	25	G-	malé, kulaté, lesklé, bílé, šedivá zóna kolem kolonií	tyčinky, nepravidelné shluky
120	49	G-	větší, kulaté, bílé až naředlé	tyčinky, nepravidelné shluky
121	18	G+	kulaté, vroubkovaný okraj, vanilkové	kokotyčinky, shluky
122	18	G-	nepravidelné, velmi vroubkovaný okraj, žlutý střed, okraj světlejší	tyčinky, nepravidelné shluky
123	48	G-	kulaté, vroubkovaný okraj, žluté	tyčinky, shluky, řetízky
124	48	G-	kulaté, šedivé, plazivý růst	koky, nepravidelné shluky
125	29	G+	menší, kulaté, vroubkovaný okraj, bílé	tyčinky, nepravidelné shluky
126	47	G+	matné, bílé až naředlé, plazivý růst	tyčinky, nepravidelné shluky
127	47	G-	kulaté, vroubkovaný okraj, žluté	tyčinky, shluky, řetízky
128	52	G+	kulaté, lesklé, bílé	krátké tyčinky, nepravidelné shluky
129	10	G+	malé, kulaté, bílé	kokotyčinky, samostatně, dvojice
130	35	G-	větší, kulaté, bílé až naředlé	tyčinky, nepravidelné shluky
131	27	G+	matné, bílé až naředlé, plazivý růst	tyčinky, nepravidelné shluky

Pokračování Tab. 15

Kód izolátu	Vzorek vína	Gramova reakce	Vzhled kolonií	Mikroskopické znaky
132	5	G-	kulaté, oranžovožluté	kokotyčinky, řetízky
133	6	G+	nepravidelné, šedivé, plazivý růst	tyčinky, dvojice, řetízky
134	13	G+	kulaté, bílé až naředlé	tyčinky, řetízky, shluky
135	19	G-	kulaté, vroubkovaný okraj, žluté	tyčinky, shluky, řetízky
136	22	G+	kulaté, vroubkovaný okraj, bílé	malé koky, nepravidelné shluky
137	4	G-	větší, kulaté, mléčné, lesklé, vypouklé	koky, nepravidelné shluky
138	4	G-	kulaté, oranžovožluté	kokotyčinky, řetízky
139	9	G+	malé, kulaté, žlutohnědé	koky, shluky
140	17	G-	nepravidelné, velmi vroubkovaný okraj, žlutý střed, okraj světlejší	tyčinky, nepravidelné shluky
141	22	G-	kulaté, vroubkovaný okraj, bílé, plazivý růst	tyčinky, nepravidelné shluky
145	20	G+	větší, kulaté, mléčné	tyčinky, nepravidelné shluky
158	28	G+	malé, kulaté, žlutohnědé	koky, shluky
159	28	G+	malé, kulaté, žlutohnědé	koky, shluky
160	5	G+	kulaté, vroubkovaný okraj, matné, bílé	krátké tyčinky, shluky
161	16	G-	větší, kulaté, bílé až naředlé	tyčinky, nepravidelné shluky
162	50	G+	nepravidelné, šedivé, plazivý růst	tyčinky, dvojice, řetízky
163	45	G+	kulaté, bílé až naředlé, vypouklé	tyčinky, řetízky, shluky
164	46	G+	nepravidelné, střed tmavší, nahnědlé, plazivý růst	tyčinky, shluky, řetízky, některé zahnuté
165	45	G+	nepravidelné, střed tmavší, nahnědlé, plazivý růst	tyčinky, shluky, řetízky, některé zahnuté
166	37	G+	nepravidelné, střed tmavší, nahnědlé, plazivý růst	tyčinky, shluky, řetízky, některé zahnuté
167	6	G+	kulaté, lesklé, bílé	krátké tyčinky, nepravidelné shluky
168	7	G+	kulaté, lesklé, bílé	krátké tyčinky, nepravidelné shluky
179	17	G+	malé, kulaté, žlutohnědé	koky, shluky
180	7	G-	kulaté, ploché, bílé až naředlé	tyčinky, samostatně, řetízky shluky
221	X35	G+	kulaté, lesklé, vypouklé, mléčné	koky, nepravidelné shluky

Pokračování Tab. 15

Kód izolátu	Vzorek vína	Gramova reakce	Vzhled kolonií	Mikroskopické znaky
222	X16	G+	nepravidelné, kulaté, vroubkovaný okraj, matné, šedé, ploché, slizké	tyčinky, řetízky, shluky
223	X27	G-	kulaté, hladké, lesklé, mléčné	koky, nepravidelné shluky
224	X26	G-	velmi malé, lesklé, vanilkové	koky, nepravidelné shluky
225	X32	G-	velmi malé, lesklé, vanilkové	koky, nepravidelné shluky
226	X29	G+	kulaté, lesklé, vypouklé, bílé	kokotyčinky, samostatně, dvojice, nepravidelné shluky
227	X18	G-	velmi malé, lesklé, vanilkové	koky, nepravidelné shluky
228	X19	G-	velmi malé, lesklé, vanilkové	koky, nepravidelné shluky
229	X33	G-	velmi malé, lesklé, vanilkové	koky, nepravidelné shluky
230	X31	G-	kulaté, vroubkovaný okraj, mléčné	nepravidelné shluky tyčinek, s myceliem
231	X16	G+	malé, kulaté, vanilkové, nahnědlé	koky, shluky
232	X40	G-	kulaté, hladké, lesklé, mléčné	koky, shluky
233	X54	G+	malé, kulaté, žlutohnědé	koky, shluky
234	X57	G+	nepravidelné, střed tmavší, nahnědlé, plazivý růst	tyčinky, shluky, řetízky, některé zahnuté
235	X38	G+	nepravidelné, střed tmavší, nahnědlé, plazivý růst	tyčinky, shluky, řetízky, některé zahnuté
236	X37	G-	kulaté, lesklé, vypouklé, mléčné	koky, nepravidelné shluky
237	X44	G-	kulaté, lesklé, vypouklé, mléčné	koky, nepravidelné shluky
265	X68	G+	slizké, střed tmavší, načervenalé, vypouklé, plazivý růst	tyčinky, řetízky, shluky
266	X62	G-	kulaté, vanilkové, střed tmavší	nepravidelné shluky tyčinek s myceliem
267	X73	G+	slizké, střed tmavší, načervenalé, vypouklé, plazivý růst	tyčinky, řetízky, shluky
268	X70	G+	malé, kulaté, vanilkové, nahnědlé	koky, shluky
269	X51	G-	malé, oválné, střed tmavší, bílé s našedlé, matné, ploché	tyčinky, nepravidelné shluky s myceliem
270	X60	G+	nepravidelné, střed tmavší, nahnědlé, plazivý růst	tyčinky, shluky, řetízky, některé zahnuté
271	X61	G+	slizké, střed tmavší, načervenalé, vypouklé, plazivý růst	tyčinky, řetízky, shluky
272	X71	G-	velmi malé, lesklé, vanilkové	koky, nepravidelné shluky

Pokračování Tab. 15

Kód izolátu	Vzorek vína	Gramova reakce	Vzhled kolonií	Mikroskopické znaky
273	X63	G-	malé, oválné, střed tmavší, bílé až naředlé, matné, ploché	nepravidelné shluky tyčinek s myceliem
274	X82	G-	malé, oválné, střed tmavší, bílé až naředlé, matné, ploché	nepravidelné shluky tyčinek s myceliem
275	X84	G-	malé, oválné, střed tmavší, bílé až naředlé, matné, ploché	nepravidelné shluky tyčinek s myceliem

Z půdy AGA bylo k další charakterizaci izolováno 41 kolonií. Z tohoto počtu bylo jako gramnegativní bakterie určeno 24 izolátů, zbývající kmeny byly zařazeny ke grampozitivním bakteriím. Opět převažovaly kolonie bílé, vanilkové až nažloutlé. U dvou kmenů (276, 277) byl zaznamenán nárůst červených vypouklých kolonií. Buňky byly nejčastěji ve tvaru kokotyčinek, které byly formované ve shlucích (18 kmenů). Jako tyčinky se jevílo 14 izolátů, opět převažovaly shluky, často tvarované jako řetízky. Zbylých 9 kmenů byly koky, nejčastěji byly pozorovány shluky tvaru hroznů (stafylokoky). Bližší charakteristika všech kmenů izolovaných na půdě AGA je uvedena v (Tab. 16)

Tab. 16 Morfologické znaky kmenů izolovaných z půdy AGA.

Kód izolátu	Vzorek vína	Gramova reakce	Vzhled kolonií	Mikroskopické znaky
142	3	G-	kulaté, lesklé, vypouklé, vanilkové	koky, shluky
143	1	G-	kulaté, lesklé, vypouklé, žluté	kokotyčinky, shluky
157	X2	G-	kulaté, lesklé, vypouklé, vanilkové	koky, shluky
169	38	G-	kulaté, lesklé, průsvitné, naředlé, slizké	kokotyčinky, shluky
170	X11	G-	velmi malé, kulaté, lesklé, bílé	tyčinky, dvojice, samostatně, řetízky, zahnuté
171	2	G+	velmi malé, kulaté, lesklé, bílé	koky, shluky, hrozny
172	X11	G-	velmi vroubkovaný okraj, lesklé, vanilkové, plazivý růst	kokotyčinky, shluky
173	43	G-	nepravidelné, slizké, naředlé, plazivý růst	krátké tyčinky, řetízky, shluky
174	43	G+	nepravidelné, ploché, matné, šedivé, plazivý růst	tyčinky, shluky
175	18	G-	nepravidelně kulaté, vypouklé, vanilkové, střed tmavší	kokotyčinky, shluky
176	32	G-	kulaté, lesklé, vypouklé, vanilkové	krátké tyčinky, shluky
177	32	G+	nepravidelné, ploché, matné, šedivé, plazivý růst	tyčinky, shluky

Pokračování Tab. 16

Kód izolátu	Vzorek vína	Gramova reakce	Vzhled kolonií	Mikroskopické znaky
178	26	G+	kulaté, vroubkovaný okraj, mléčné, střed tmavší, ploché, suché	tyčinky, shluky s myceliem
181	8	G+	nepravidelný tvar, ploché, našedlé, plazivý růst	tyčinky, dvojice, řetízky, shluky
182	3	G+	velmi malé, kulaté, lesklé, bílé	koky, shluky, hrozny
183	36	G+	nepravidelné, ploché, matné, šedivé, plazivý růst	tyčinky, shluky
184	2	G-	kulaté, lesklé, průsvitné, našedlé	kokotyčinky, shluky
185	36	G+	kulaté, lesklé, průsvitné, našedlé	tyčinky, shluky
186	1	G+	malé, kulaté, lesklé, bílé	kokotyčinky, shluky
187	15	G-	kulaté, lesklé, vypouklé, vanilkové	kokotyčinky, shluky
188	23	G-	nepravidelné, ploché, vanilkové, plazivý růst	kokotyčinky, shluky
190	21	G-	nepravidelné, ploché, vanilkové, plazivý růst	kokotyčinky, shluky
191	40	G-	nepravidelné, ploché, vanilkové, plazivý růst	kokotyčinky, shluky
192	40	G-	velmi vroubkovaný okraj, lesklé, vanilkové, plazivý růst	kokotyčinky, shluky
193	11	G+	velmi malé, kulaté, lesklé, bílé	koky, shluky, hrozny
194	41	G-	kulaté, lesklé, vypouklé, vanilkové	kokotyčinky, shluky
195	44	G-	kulaté, lesklé, vypouklé, vanilkové	kokotyčinky, shluky
196	39	G+	velmi malé, kulaté, lesklé, bílé	koky, shluky, hrozny
197	41	G+	velmi malé, kulaté, lesklé, bílé	koky, shluky, hrozny
198	38	G+	větší, kulaté, lesklé, mléčné mírně nahnědlé	tyčinky, propletené, shluky
199	39	G-	nepravidelné, ploché, vanilkové, plazivý růst	kokotyčinky, shluky
200	44	G+	velmi malé, kulaté, lesklé, bílé	koky, shluky, hrozny
201	8	G-	nepravidelné, ploché, vanilkové, plazivý růst	kokotyčinky, shluky
219	X28	G+	malé, lesklé, vypouklé, vanilkové, nahnědlé	koky, shluky
238	X47	G+	kulaté, nepravidelné, lesklé, vanilkové	tyčinky, shluky
239	X43	G+	nepravidelné, střed tmavší, vanilkové nahnědlé	tyčinky, shluky s myceliem
276	X67	G-	kulaté, vypouklé, lesklé, načervenalé	tyčinky, shluky, řetízky, řetízky
277	X67	G-	kulaté, vypouklé, lesklé, načervenalé	tyčinky, shluky, řetízky, řetízky
278	X63	G-	kulaté, lesklé, vypouklé, vanilkové	kokotyčinky, shluky



Pokračování Tab. 16

Kód izolátu	Vzorek vína	Gramova reakce	Vzhled kolonií	Mikroskopické znaky
279	X63	G-	kulaté, lesklé, vypouklé, vanilkové	kokotyčinky, shluky
280	X63	G-	vroubkovaný okraj, lesklé, vanilkové, plazivý růst	kokotyčinky, shluky

Z půdy MRS bylo izolováno 9 kmenů. Většina, a to 7 kmenů, byly grampozitivní. Kolonie byly vanilkové, bílé, občas našedlé. Poměr koků a tyčinek byl shodný 4 : 4, buňky jednoho izolátu byly kokotyčinky. Podrobnější popis morfologických znaků všech kmenů izolovaných z půdy MRS je uveden v *Tab. 17*.

*Tab. 17* Morfologické znaky kmenů izolovaných z půdy MRS .

Kód izolátu	Vzorek vína	Gramova reakce	Vzhled kolonií	Mikroskopické znaky
53	2	G-	kulaté, lesklé, vypouklé, mléčné	koky, shluky
54	2	G+	kulaté, lesklé, vypouklé, vanilkové, nádech hnědé	kokotyčinky, samostatně, dvojice, řetízky
55	42	G+	malé, kulaté, lesklé, vypouklé, bílé	koky, shluky, hrozny, sarciny
152	6	G+	nepravidelný tvar, matné, vanilkové, nádech hnědé	tyčinky, shluky, některé zakřivené
153	42	G+	malé, kulaté, lesklé, vypouklé, bílé	koky, shluky, hrozny, sarciny
244	X44	G-	vroubkovaný okraj, šedivé, plazivý růst	krátké tyčinky, shluky
245	X44	G+	nepravidelně kulaté, bílé, šedivá zóna kolem, ploché	tyčinky samostatně, dvojice, shluky
246	X44	G+	nepravidelné, kulaté, bílé, šedivá zóna kolem, ploché	tyčinky samostatně, dvojice shluky
264	X72	G+	malé, kulaté, lesklé, vypouklé, bílé	koky, shluky

K izolaci bakterií byla použita plotnová metoda s půdami AGA, AA, M17, TJA, PCA, MRS. Cílem našeho zájmu byly bakterie mléčného kvašení a také bakterie octového kvašení.

Pro izolaci bakterií mléčného kvašení byly použity půdy MRS, M17 a TJA. Z celkového počtu 271 izolovaných kmenů bylo 140 kmenů grampozitivních a 131 kmenů gramnega-

tivních. Na půdách M17 a MRS lze výskyt grampozitivních koků ve dvojicích, čtveřicích nebo řetězcích označit jako bakterie mléčného kvašení, které převážně pod mikroskopem tato uskupení vytvářejí. Je možné, že se jednalo o laktokoky, oenokoky, pediokoky a případně i jiné zástupce. O bakterie mléčného kvašení se mohlo jednat i u jiných grampozitivních koků, formovaných v nepravidelných shlucích. V případě grampozitivních tyčinek izolovaných z půd MRS a M17 a uspořádaných jednotlivě nebo v řetězcích (popř. dvojicích) lze rovněž usuzovat za přítomnost BMK, v tomto případě laktobacilů, které bývají rovněž velmi často izolovány z vín. [41, 43, 59]

Pro stanovení bakterií octového kvašení byly použity půdy AGA a AA. Tyto půdy obsahují uhličitán vápenatý, který bakterie octového kvašení dokážou rozkládat, a v médiu pod koloniemi tak vznikala projasněná místa. Jako bakterie octového kvašení bychom mohly označit ty, které byly stanoveny jako gramnegativní, krátké tyčinky (popř. i kokotyčinky) nejčastěji formované do řetězků. Bakterie octového kvašení jsou považovány za kontaminanty vína, jejich výskyt je známkou nedostatečné hygieny sklepů, lahvoven, ostatního zařízení a známkou nesprávné techniky ošetřování a školení vína. [59]

Na půdě PCA byl stanoven celkový počet mikroorganismů, zde se mohlo jednat jak o bakterie mléčného kvašení, tak i o jiné bakterie, které se do vína dostaly z prostředí (z hroznů) nebo při technologickém procesu při manipulaci se vzorky vína.

*Obr. 4. Ukázka růstu čistých kultur bakterií izolovaných z vín.*



Zleva izoláty 207 (půda M17), 111 (půda M17), 88 (půda M17).

Obr. 5. Ukázka růstu čistých kultur bakterií izolovaných z vín.

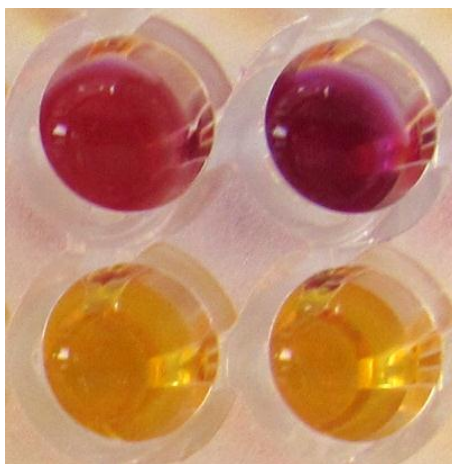


Zleva izoláty 258 (půda M17), 215 (půda M17), 197/198 (půda PCA).

### 7.3 Zjišťování produkce biogenních aminů v dekarboxylačním médiu

Schopnost dekarboxylace 5 aminokyselin (lyzinu, argininu, ornitinu, tyrozinu a histidinu) byla detekována na mikrotitračních destičkách pomocí skriningové kultivační metody a to po 24 (48) hodinové kultivaci bakterií v dekarboxylačním médiu. Pozitivní reakce se projevila změnou zbarvení kultivačního média z hnědožluté barvy na fialovou (Obr. 6). Výsledky jsou shrnuty v Tab. 18.

Obr. 6. Ukázka pozitivní a negativní dekarboxylázové reakce v médiu s aminokyselinou a pH indikátorem.



Tab. 18. Dekarboxylace aminokyselin kmeny izolovanými na půdě PCA

Kód izolá- tu	Vzorek vína (číslo)	lyzin	arginin	ornitin	tyrozin	histidin
1	16	+	+	+	+	-
2	16	+	+	+	+	+/-
3	49	+	+	+	+	+/-
4	10	+	+	+	+	+/-
5	10	+	+	+	+	+/-
6	25	+	+	+	+	+/-
7	47	+	+	+	+	+/-
8	47	+	+	+	+	+/-
9	13	+	+	+	+	-
10	13	+	+	+	+	+
11	1	+	+	+	+	+/-
12	28	+	+	+	+	+/-
13	9	+	+	+	+	+/-
14	15	+	+	+	+	+/-
15	19	+	+	+	+	+/-
16	21	+	+	+	+	+/-
17	7	+	+	+	+	-
18	7	+	+	+	+	-
19	11	+	+	+	+	+/-
20	11	+	+	+	+	+/-
21	12	+	+	+	+	+/-
22	12	+	+	+	+	+/-
23	41	+	+	+	+	+/-
24	41	+	+	+	+	+/-
25	41	+	+	+	+	-
26	34	+	+	+	+	-
27	42	+	+	+	+	+/-
28	42	+	+	+	+	+
29	8	+	+	+	+	+/-
30	8	+	+	+	+	+/-
32	27	+	+	+	+	+/-
33	27	+	+	+	+	+/-
34	27	+	+	+	+	-
35	27	+	+	+	+	-

Pokračování Tab. 18

Kód izolá- tu	Vzorek vína (číslo)	lyzin	arginin	ornitin	tyrozin	histidin
36	17	+	+	+	+	+/-
37	17	+	+	+	+	+
38	33	+	+	+	+	+/-
39	6	+	+	+	+	+/-
40	3	+	+	+	+	+/-
41	3	+	+	+	+	-
42	5	+	+	+	+	-
43	5	+	+	+	+	+/-
44	39	+	+	+	+	+/-
45	39	+	+	+	+	+/-
46	39	+	+	+	+	+/-
47	36	+	+	+	+	+/-
48	36	+	+	+	+	+/-
49	X7	+	+	+	+	+/-
50	X7	+	+	+	+	+/-
51	X11	+	+	+	+	+/-
52	X9	+	+	+	+	+
146	X2	+	+	+	+	+
147	19	+	+	+	+	-
149	44	+	+	+	+	+
202	X16	+	+	+	+	+/-
204	X30	+	+	+	+	+/-
205	X31	+	+	+	+	-
247	X37	+	+	+	+	-
248	X70	+	+	+	+	-
249	X52	+	+	+	+	-

+ ... pozitivní reakce;

- ... negativní reakce;

+/- ... slabá reakce.

Z výsledků uvedených v *Tab. 18* vyplývá, že u všech testovaných bakterií izolovaných z půdy PCA byla po 24 hodinách zjištěna dekarboxylace lyzinu, argininu, ornitinu a tyrozi-

nu. Změna zbarvení dekarboxylačního média obsahujícího aminokyselinu histidin byla pozorována u 6 kmenů, u 39 kmenů byla pozorována slabá reakce na dekarboxylaci histidinu.

Tab. 19 Dekarboxylace aminokyselin kmeny izolovanými na půdě M17.

Kód izolátu	Vzorek vína	lyzin	arginin	ornitin	tyrozin	histidin
56	15	-	-	-	+	-
57	28	-	-	-	+	-
58	28	-	-	-	+	-
59	23	-	-	-	+	-
60	23	-	-	-	+	-
61	10	-	-	-	+	-
62	38	-	-	-	+	-
63	12	-	-	-	+	-
64	12	-	-	-	+	-
65	11	+	-	-	+	-
66	17	-	-	-	+	-
67	17	-	-	-	+	-
68	39	+/-	-	-	+	-
69	39	-	-	-	+	-
70	22	-	-	-	+	-
71	22	-	-	-	+	-
72	34	-	-	-	+	-
73	36	-	-	-	+	-
74	27	-	-	-	+	-
75	3	-	-	-	+	-
76	19	-	-	-	+	-
77	40	-	-	-	+	-
78	40	-	-	-	+	-
79	13	+	+	-	+	-
80	4	-	-	-	+	-
81	20	-	-	-	+	-
82	43	-	-	-	+	-
83	47	+/-	-	-	+	-
84	47	+	+	-	+	-
85	49	+/-	+	-	+	-
86	49	+	+	-	+	-
87	52	+	+	+	+	+
88	35	-	+	-	+	-

Pokračování Tab. 19

Kód izolátu	Vzorek vína	lyzin	arginin	ornitin	tyrozin	histidin
89	25	+	+	+/-	+	-
90	10	-	+	-	+	-
91	45	+	+	-	+	+
92	45	+	+	-	+	-
93	9	+	+/-	-	+	-
94	43	-	-	-	+	-
95	32	-	-	-	+	-
96	50	+	+	-	+	-
97	41	+	+	+	+	-
98	8	+/-	+	-	+	-
99	5	-	+	-	+	-
100	37	+/-	+	-	+	-
101	16	-	-	-	+	-
102	16	+/-	-	-	+	-
103	18	-	-	-	+	-
104	48	+	+	+	+	+
105	26	+	+	-	+	-
106	X3	-	+	-	+	-
107	X7	+	+/-	-	+	-
108	X2	-	-	-	+	-
109	X11	-	+	-	+	-
110	4 TJA	+	+	-	+	-
111	1 TJA	+	+	-	+	-
112	3 TJA	+	+	-	+	-
150	21	+	+	-	+	-
151	14	-	+/-	-	+	-
156	7	-	-	-	+	-
207	X29	-	-	-	+	-
208	X19	-	+	-	+	-
209	X33	-	+	-	+	-
210	X31	-	-	-	+	-
211	X26	-	-	-	+	-
212	X22	-	-	-	+	-
213	X24	-	-	-	+	-
214	X32	-	+	-	+	-
215	X35	-	+	-	+	-
216	X18	-	+	-	+	-
217	X16	+	+	+	+	-
218	X16	-	+	-	+	-

Pokračování Tab. 19

Kód izolátu	Vzorek vína	lyzin	arginin	ornitin	tyrozin	histidin
240	X47	-	-	-	+	-
241	X45	-	-	-	+	-
242	X56	-	-	-	+	-
243	X40	-	+/-	-	+	-
251	X74	-	+	-	+	-
252	X80	-	+	-	+	-
253	X69	-	+	-	+	-
254	X79	-	+	-	+	-
255	X79	-	-	-	+	-
256	X73	-	-	-	+	-
257	X52	-	-	-	+	-
258	X70	-	+	-	+	-
259	X62	-	+	-	+	-
260	X84	-	+	-	+	-
261	X81	-	+/-	-	+	-
262	X84	-	+	-	+	-
263	X63	-	-	-	+	-

+ ... pozitivní reakce;

- ... negativní reakce;

+/- ... slabá reakce.

Po 48 hodinové kultivaci bakterií izolovaných z půdy M17 byla pozorována změna dekarboxylačního kultivačního média obsahujícího aminokyselinu lyzin u 19 izolovaných bakterií, 6 kmenů vykazovalo slabou reakci. Zbývajících 64 kmenů vykazovalo negativní reakci, nedošlo k barevné změně dekarboxylačního média s aminokyselinou lyzinem.

Dekarboxylace aminokyseliny argininu byla po 48 hodinách kultivace u stejné skupiny bakterií zjištěna u 38 izolátů, 5 kmenů vykazovalo slabou reakci. U zbylých 46 kmenů nebyla pozorována změna barvy média.

Dekarboxylace ornitinu byla zjištěna pouze u malého počtu bakterií izolovaných z půdy M17, a to u 4 kmenů, 1 kmen vykazoval slabou reakci, 95 % kmenů bylo negativních.



Nejvíce pozitivních reakcí bylo u této skupiny bakterií zaznamenáno po 48 hodinové kultivaci v dekarboxylačním médiu s aminokyselinou tyrozinem. Dekarboxylace tyrozinu byla zjištěna prakticky u všech bakterií.

Nejmenší schopnost dekarboxylace byla zjištěna u aminokyseliny histidinu. Po 48 hodinách byla pozitivní reakce u 3 kmenů, zbylých 97% izolátů vykazovalo negativní reakci, protože nedošlo k barevné změně dekarboxylačního média.

Tab. 20 Dekarboxylace aminokyselin kmeny izolovanými na půdě AA

Kód izolátu	Vzorek vína	lyzin	arginin	Ornitin	tyrozin	histidin
113	33	+	+	+	+	+/-
114	33	+	+	+	+	+/-
115	X1	+	+	+	+	+
116	X14	+	+	+	+	+
117	X7	+	+	+	+	+/-
118	X5	+	+	+	+	+
119	25	+	+	+	+	+/-
120	49	+	+	+	+	+/-
121	18	+	+	+	+	+/-
122	18	+	+	+	+	+
123	48	+	+	+	+	+
124	48	+	+	+	+	+
125	29	+	+	+	+	+/-
126	47	+	+	+	+	+
127	47	+	+	+	+	+
128	52	+	+	+	+	+
129	10	+	+	+	+	+/-
130	35	+	+	+	+	+
131	27	+	+	+	+	+/-
132	5	+	+	+	+	+
133	6	+	+	+	+	+/-
134	13	+	+	+	+	+/-
135	19	+	+	+	+	+
136	22	+	+	+	+	+
137	4	+	+	+	+	+/-
138	4	+	+	+	+	+
139	9	+	+	+	+	+/-

Pokračování Tab. 20

Kód izo- látu	Vzorek vína	lyzin	arginin	Ornitin	tyrozin	histidin
140	17	+	+	+	+	+/-
141	22	+	+	+	+	+
145	20	+	+	+	+	+/-
158	28	+	+	+	+	+
159	28	+	+	+	+	+/-
160	5	+	+	+	+	+/-
161	16	+	+	+	+	+/-
162	50	+	+	+	+	+/-
163	45	+	+	+	+	-
164	46	+	+	+	+	+/-
165	45	+	+	+	+	+/-
166	37	+	+	+	+	+/-
167	6	+	+	+	+	+/-
168	7	+	+	+	+	+/-
179	17	+	+	+	+	+/-
180	7	+	+	+	+	+
221	X35	+	+	+	+	+/-
222	X16	+	+	+	+	+
223	X27	+	+	+	+	+
224	X26	+	+	+	+	+/-
225	X32	+	+	+	+	+/-
226	X29	+	+	+	+	-
227	X18	+	+	+	+	+/-
228	X19	+	+	+	+	+/-
229	X33	+	+	+	+	+/-
230	X31	+	+	+	+	+/-
231	X16	+	+	+	+	+/-
232	X40	+	+	+	+	+
233	X54	+	+	+	+	+
234	X57	+	+	+	+	+/-
235	X38	+	+	+	+	+
236	X37	+	+	+	+	+
237	X44	+	+	+	+	+
265	X68	+	+	+	+	+/-

Pokračování Tab. 20

Kód izo- látu	Vzorek vína	lyzin	arginin	Ornitin	tyrozin	histidin
266	X62	+	+	+	+	-
267	X73	+	+	+	+	+/-
268	X70	+	+	+	+	+
269	X51	+	+	+	+	+/-
270	X60	+	+	+	+	+/-
271	X61	+	+	+	+	+
272	X71	+	+	+	+	-
273	X63	+	+	+	+	+/-
274	X82	+	+	+	+	+/-
275	X84	+	+	+	+	+/-

+ ... pozitivní reakce;

- ... negativní reakce;

+/- ... slabá reakce.

Schopnost dekarboxylace aminokyselin lyzinu, argininu, ornitinu a tyrozinu byla pozorována po 24 hodinách u všech kmenů bakterií izolovaných z půdy AA (Tab. 20). Dekarboxylace aminokyseliny histidinu byla zjištěna u 26 kmenů, u 41 kmenů proběhla slabá reakce a u 4 kmenů byla reakce negativní.

Tab. 21 Dekarboxylace aminokyselin kmeny izolovanými na půdě AGA

Kód izo- látu	Vzorek vína	lyzin	arginin	Ornitin	tyrozin	histidin
142	3	+	+	+	+	+
143	1	+	+	+	+	+
157	X2	+	+	+	+	+
169	38	+	+	+	+	+
170	X11	+	+	+	+	+
171	2	+	+	+	+	+
172	X11	+	+	+	+	+
173	43	+	+	+	+	+
174	43	+	+	+	+	+
175	18	+	+	+	+	+

Pokračování Tab. 21

Kód izo- látu	Vzorek vína	lyzin	arginin	Ornitin	tyrozin	histidin
176	32	+	+	+	+	+
177	32	+	+	+	+	+
178	26	+	+	+	+	+
181	8	+	+	+	+	+/-
183	36	+	+	+	+	+/-
184	2	+	+	+	+	+/-
185	36	+	+	+	+	+/-
186	1	+	+	+	+	+/-
187	15	+	+	+	+	+
188	23	+	+	+	+	+/-
190	21	+	+	+	+	+
191	40	+	+	+	+	+
192	40	+	+	+	+	+
193	11	+	+	+	+	+/-
194	41	+	+	+	+	+/-
195	44	+	+	+	+	+
198	38	+	+	+	+	+/-
199	39	+	+	+	+	+/-
200	44	+	+	+	+	+/-
201	8	+	+	+	+	+
219	X28	+	+	+	+	+/-
238	X47	+	+	+	+	+
239	X43	+	+	+	+	+
276	X67	+	+	+	+	+/-
277	X67	+	+	+	+	+/-
278	X63	+	+	+	+	+/-
279	X63	+	+	+	+	+/-
280	X63	+	+	+	+	+/-

+ ... pozitivní reakce;

- ... negativní reakce;

+/- ... slabá reakce.

Pozitivní reakce na dekarboxylaci lyzinu, argininu, ornitinu a tyrozinu byly stanoveny u všech kmenů bakterií izolovaných z půdy AGA (*Tab. 21*). Pozitivní reakce byla pozorována i v případě dekarboxylace aminokyseliny histidinu, avšak u 45 % kmenů byla zjištěna slabá pozitivní reakce.

*Tab. 22* Dekarboxylace aminokyselin kmeny izolovanými na půdě MRS

Kód izolátu	Vzorek vína	lyzin	arginin	ornitin	tyrozin	histidin
53	2	+	+	+	+	-
54	2	+	+	+	+	+
55	42	+	+	+	+	+/-
152	6	+	+	+	+	+/-
153	42	+	+	+	+	+/-
244	X44	+	+	+	+	+/-
245	X44	+	+	+	+	+/-
246	X44	+	+	+	+	+
264	X72	+	+	+	+	+/-

+ ... pozitivní reakce;

- ... negativní reakce;

+/- ... slabá reakce.

V případě bakteriálních kmenů izolovaných z půdy MRS byla u všech kmenů zjištěna pozitivní reakce na dekarboxylaci aminokyselin lyzinu, argininu, ornitinu a tyrozinu (*Tab. 22*). Kultivační metodou byla také u 2 kmenů zjištěna dekarboxylace aminokyseliny histidinu, u 6 kmenů byla pozorována slabá reakce a 2 kmeny nebyly schopny dekarboxylovat tuto aminokyselinu.

Tvorba biogenních aminů byla detekována na mikrotitračních destičkách pomocí skrínin-gové metody s kultivačním médiem obsahujícím příslušnou aminokyselinu (lyzin, arginin, ornitin, tyrozin a histidin). Kultivační metoda pro zjištění produkce biogenních aminů byla provedena u 267 izolovaných kmenů. Z počtu všech testů provedených na dekarboxylaci aminokyselin bylo nejvíce pozitivních výsledků zaznamenáno v případě dekarboxylace tyrozinu, proběhla u všech izolátů, dále následovala dekarboxylace argininu u 216 izolátů, lyzinu (197 izolátů), ornitinu (182 izolátů) a nejmenší schopnost dekarboxylace byla poz-

rována u aminokyseliny histidinu (58 izolátů). Je možné, že výsledky jsou ovlivněny falešně pozitivními výsledky nebo falešně negativními reakcemi.

Falešně pozitivní výsledky mohly být důsledkem vzniku jiných alkalických sloučenin než biogenních aminů, které mohou vznikat metabolickou činností bakterií. Příkladem takového produktu, který navíc souvisí s metabolismem dusíkatých látek, včetně proteinů, je např. amoniak. [63, 64] Falešně negativní výsledky mohly vzniknout vlivem fermentace sacharidů, čímž mohlo dojít ke snížení pH média i v přítomnosti zásaditých biogenních aminů. Další možnou příčinou falešně negativních výsledků může být nedostatečná produkce biogenních aminů, která ještě nezpůsobila změnu zbarvení dekarboxylačního média. V našem případě byla do dekarboxylačního média přidána příslušná aminokyselina v koncentraci 0,2% w/v, což je koncentrace, která zpravidla postačuje k vyvolání tvorby dekarboxylázových enzymů (tyto enzymy jsou inducibilní) a tudíž i produkci BA. Nicméně u některých kmenů mohlo být toto množství aminokyseliny nedostatečné k produkci BA, protože množství vyprodukovaného BA rovněž závisí na koncentraci příslušné aminokyseliny v prostředí média. [63, 64]

I přes určitá negativa lze tuto metodu ke zjišťování produkce BA využít tehdy, pokud je cílem právě „jen“ skríníng mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou. Na druhou stranu určitou výhodou je, že tato metoda je technicky a materiálně nenáročná oproti dalším metodám, které lze využít ke zjišťování produkce BA.

Další metodou, kterou lze využít ke zjišťování dekarboxylázové aktivity mikroorganismů, je PCR. Tuto metodu lze rovněž považovat za skríníngovou, i když množství falešně pozitivních/negativních reakcí bývá u této metody prakticky nulový. PCR metoda je prakticky stejně materiálně náročná jako chromatografické metody (zejména HPLC), které lze rovněž využít k detekci biogenních aminů, avšak výhodnější v tom, že v kratším časovém úseku lze analyzovat více kmenů. Z tohoto důvodu jsou v poslední době vyvíjeny protokoly pro PCR, tak aby mohla být metoda využita k rychlé detekci bakterií produkujících biogenní aminy. [33, 63, 64] Klasická PCR je specifická metoda, která poukazuje na existenci genu pro příslušný enzym (např. tyrozindekarboxylázu, histidindekarboxylázu, apod.), tedy vypovídá o potenciálu kmene produkovat příslušný biogenní amin. Určitou nevýhodu u této metody lze však spatřovat v tom, že tato metoda nezodpoví otázku, zda je biogenní amin za daných podmínek skutečně produkován a v jakém množství. [63, 64] V poslední době se

ke zjišťování přítomnosti genů pro dekarboxylázové enzymy začíná využívat i metody real-time PCR. [63, 64]

Pomocí chromatografických metod naopak dokážeme srovnat množství produkovaného biogenního aminu za různých podmínek fermentace. Nevýhodou však je skutečnost, že v případě nevhodných podmínek pro expresi genu, resp. aktivitu enzymu, nezjistíme těmito metodami, zda daný kmen má schopnost produkovat biogenní amin. Je tedy výhodné v praxi kombinovat obě specifické metody – PCR i chromatografické techniky. [33, 38, 63, 64]

Dekarboxylací všech zmiňovaných aminokyselin mohou ve víně vznikat biogenní aminy. Tyto sloučeniny mohou mít toxický efekt v případě, že jsou požitý ve velkém množství. Biogenní aminy ve víně by se neměly vyskytovat, nebo jen v nepatrných koncentracích do 0,5 mg/l. Pokud je jejich množství nad 10 mg/l může to poukazovat na přítomnost mikroorganismů, zejména některých kmenů *Pediococcus damnosus*, které vykazují zvýšenou aktivitu dekarboxylázy během spontánní malolaktické fermentace. Vysoká koncentrace histaminu ve víně je způsobena přítomností histidindekarboxylázy některých bakterií mléčného kvašení. S vysokou koncentrací histaminu bývá spojován zejména rod *Pediococcus*. Může být však produkován i jinými bakteriemi mléčného kvašení jako například *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus buchneri*, *Lb. hilgardii*, *Pediococcus parvulus*. Histamin vzniká většinou během alkoholového kvašení a podle některých autorů se jeho obsah během jablečno-mléčného kvašení snižuje. [65, 66] Histamin může být považován za indikátor dodržení hygienických podmínek při výrobě. U většiny analyzovaných vzorků v této práci (209 izolátů) nebyl detekován. Relativně vyšší obsah histaminu ve víně může znamenat chybu při výrobě vína a může mít za následek nepříznivé sensorické hodnocení vína. Dekarboxylací argininu a ornitinu může být ve víně produkován putrescin, ten bývá produkován zejména kmeny *Oenococcus oeni*, ale také *Lactobacillus buchneri*. [65, 66] Dekarboxylací tyrozinu ve víně může vznikat tyramin, s jeho produkcí jsou spojovány kmeny *Lactobacillus brevis*, *Lb. hilgardii* a také *Leuconostoc*. Tyramin se dle některých autorů nachází na nejvyšší úrovni v neprokvašeném moštu. [65, 66] Aplikace startovacích kultur *Saccharomyces cerevisiae* při alkoholovém kvašení a *Oenococcus oeni* při jablečno-mléčném kvašení může vést ke snížení a potlačení vzniku biogenních aminů ve víně. BA se tvoří během různých stupňů výroby vína, jejich obsah ve víně bývá vyšší než v moštu. [65, 66] Dle některých autorů je vznik aminů během alkoholového kvašení způsoben kva-

sinkami. Velmi důležitá je přitom hodnota pH, protože při vyšší hodnotě než 3,6 jsou bakteriální přeměny podporovány. Nekontrolované jablečno-mléčné kvašení může vést ke zvýšené produkci BA. [65, 66] Hotové víno obsahuje vysokou úroveň volných aminokyselin, které mohou být dekarboxylovány reziduální mikroflórou, navíc může také enzymová aktivita přetrvávat i po vymizení populace životaschopných bakterií. Při zrání vína mohou být aminokyseliny uvolňovány i degradací kvasinek. Obecně nejrozšířenějšími aminy jsou putrescin, histamin a tyramin, ty jsou produkovány zejména na začátku procesu zrání vína. Dodatečně mohou být BA odstraněny čiřícími prostředky. [10, 65, 66]

Víno může u řady lidí vyvolat řadu symptomů, podobných alergiím, např. zrudnutí, svědění, bolesti hlavy, nadýmání, průjem aj. Biogenní aminy se považují za nejvýznamnější příčinu intolerance vína a sní spojenými problémy. V červených vínech bývá obvykle vyšší koncentrace BA než ve vínech bílých. [67] Z alkoholických nápojů právě červená vína vyvolávají nejčastěji nežádoucí reakce. I když červená vína obsahují jen mírné koncentrace BA ve srovnání se sýry (až 2 500 mg/kg), uzeninami (až 600 mg/kg) tak intolerance červeného vína může být typickým markerovým symptomem a proto byla navržena jako model pro intoleranci histaminu. [67] Farmakologické vlastnosti biogenních aminů ve víně jsou pravděpodobně umocněny některými vedlejšími účinky etanolu, jako např. potenciální narušení drah metabolizujících aminy nebo zvýšená permeabilita střev. Klinické pokusy ukazují, že ne všechna červená vína vyvolávají ve stejné míře nežádoucí reakce. [67] Výzkumníci v Rakousku provedli studii, v které zjišťovali obsah histaminu a jiných BA ve stovce kvalitních červených vín. Vysoce kvalitní vína byla zvolena, aby se eliminoval vliv špatných hygienických podmínek během výroby vína, který může způsobit přítomnost BA ve vysokých koncentracích. Histamin a další biogenní aminy (isoamylamin, tryptamin, fenyletylamin, kadaverin, putrescin, tyramin, spermidin, spermin) byly stanovovány za pomoci metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie. K této studii byla použita vína vyrobená ze sedmi různých odrůd hroznového vína Zweigeltrebe (25), Blaufränkisch (25), Merlot (10), St. Laurent (10), Pinot noir (10), Shiraz (10), Cabernet-Sauvignon (10). Výsledky ukázaly, že obsah histaminu a dalších biogenních aminů se u červených vín značně liší bez ohledu na odrůdu vína a že jejich vysoký obsah je i u vysoce kvalitních vín. V případě že by v EU byl zaveden legislativní limit pro obsah histaminu ve víně ve výši 10 mg/l, pak by 34% analyzovaných vín muselo být staženo z trhu. [67]



Sledování biogenních aminů ve víně je důležité z hlediska zdravotní nezávadnosti a z hlediska kvality vín. Z důvodů prevence produkce biogenních aminů ve víně je třeba důsledné dodržování hygienických předpisů a dodržování správné výrobní praxe.

## 8 ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na mikrobiologický rozbor 2 sérií vzorků vín. První řada vín obsahovala 48 vzorků vín a druhá řada 84 vzorků. Každý ze vzorků vína byl za účelem zjišťování počtu vybraných skupin bakterií vyskytujících se ve víně vyočkován na 6 živných médií (AA, AGA, MRS, TJA, PCA, M17), po inkubaci byl sledován rozdíl u jednotlivých vzorků vín. Vybrané kolonie získané z jednotlivých vzorků vín byly zachovány pro další rozbor. U jednotlivých kmenů byla provedena základní morfologická a mikroskopická charakteristika. Posledním úkolem byl průkaz dekarboxylace aminokyselin (lyzinu, argininu, ornitinu, tyrozinu a histidinu), byla použita skrínigová kultivační metoda.

Na základě výsledků této studie lze konstatovat:

- U první série vzorků byl pozorován zvýšený výskyt mikroorganismů a jejich růst se zvyšující se teplotou. Po dosažení maximální teploty a jejím následném snižování docházelo k úbytku životaschopné mikroflóry.
- U druhé série vzorků vín, která pocházela od dvou vinařů, byl sledován vývin mikroorganismů u vín zaočkovaných kulturou a vín kontrolních (nezaočkovaných). U prvního vinaře byl u vína Cabernet zjištěn vyšší výskyt životaschopných mikroorganismů u vín nezaočkovaných kulturou zodpovědnou za jablečno-mléčné kvašení. U vzorků vína Zweigeltrebe byl naopak zřetelný rozvoj mikroflóry u vín zaočkovaných tutéž kulturou. U druhého vinaře zaočkované víno Zweigeltrebe nevykazovalo podstatný nárůst mikroorganismů, u kontrolních vzorků docházelo k postupnému odumírání mikroflóry. U vína Cabernet nebyl pozorován zvýšený nárůst mikroorganismů u žádného ze vzorků vín.
- Celkem se podařilo izolovat 271 kmenů bakterií. Z toho bylo 140 (52 %) grampozitivních a 131 (48 %) gramnegativních. Jako tyčinky se pod mikroskopem jevílo 155 kmenů (57 %), 82 (30 %) kmenů byly koky a zbylých 34 kmenů (13 %) byly kokotyčinky.
- Kultivační metodou byla po 48 hodinách kultivace stanovena dekarboxylázová aktivita u 89 kmenů izolovaných z půdy M17, nejčastěji byla pozorována dekarboxylace tyrozinu (100 % kmenů), poté argininu (38 kmenů), lyzinu (19 kmenů), ornitinu (4 kmeny) a nejméně pozitivních reakcí bylo u aminokyseliny histidinu (3 kmeny).

- Po 24 hodinách kultivace byla stanovena dekarboxylázová aktivita u 178 kmenů izolovaných z půd PCA, AA, AGA a MRS. U aminokyselin lyzinu, argininu, ornitinu a tyrozinu byla u všech vzorků pozorována změna zbarvení dekarboxylačního média. V případě aminokyseliny histidinu byla dekarboxylace zjištěna u 55 kmenů, u 102 kmenů proběhla slabá reakce a 21 kmenů bylo negativních.
- Je možné, že kultivační metodou byly zjištěny falešné pozitivní výsledky

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] Robinson, Richard K. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volumes 1-3. (pp: 2306,2307-2310). Elsevier,2000. ISBN.9780122270703
- [2] KADLEC, P.: *Technologie potravin II*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 2002. s. 182-189.
- [3] ČEPIČKA, Jaroslav, et al. *Obecná potravinářská technologie*. 1. vyd. Praha : Premisa, 1995. Skripta. ISBN 8070802391. Vinná Réva, s. 200-207.
- [4] KRAUS, V., FOFFOVÁ, Z., VURM, B.: *Nová encyklopedie českého a moravského vína* 2. díl, Praha 2008, ISBN 978-80-86767-09-3
- [5] PAVLOUŠEK, Pavel. *Výroba vína u malovinařů*. první. Praha: Grada Publishing, a.s., 2006, 96 s. ISBN 80-247-1247-4.
- [6] DHARMADHIKARI, Murli. *Composition of Grapes*. In: [online]. [cit. 2012-02-27]. Dostupné z: <http://www.extension.iastate.edu/NR/rdonlyres/A647BBD4-08D5-494B-A55B-680667E6C342/56373/compositionofgrapes.pdf>
- [7] ROP, Otakar a Jan HRABĚ. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*. první. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009, 129 s. ISBN 978-80-7318-748-4.
- [8] MALÍK, F., MINÁRIK, E.: *Liehovarníctvo, Droždiarstvo, Vinárstvo : Vinárstvo*. 1. vyd. Bratislava : Ediční středisko SVŠT , 1983. s. 3-123.
- [9] FARKAŠ, Ján. *Technology and biochemistry of wine*. druhé. London: Gordon and Breach Science Publishers, 1988, 712 s. ISBN 2-88124-069-0.
- [10] LIŠKOVÁ, Simona. *Výskyt bakterií mléčného kvašení ve víně*. Zlín, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Leona Buňková.
- [11] STEIDL, R.; RENNER, W. *Problémy kvašení vín*. 1.vydání. Valtice : Národní salon vín, 2004. 74 s. ISBN 80-903201-3-9
- [12] NASE, Joseph. *The sommelier: Proper transference makes wine taste better. So pour it out!. New Yourk magazine* [online]. [cit. 2012-02-20]. Dostupné z: <http://nymag.com/restaurants/articles/wine/essentials/decanting.htm>

- [13] TRACY, Robert a Bevan SKAALLEN. *Bottling- last line of microbial defense. Practical Winery and Vineyard journal*. 2009.
- [14] STEIDL, R. *Sklepní hospodářství*. 1.vydání. Valtice : Národní salon vín, 2002. 307 s. ISBN 80-903201-0-4
- [15] CITRIGLIA, Matthew. *The Flavor of Wine*. *Winegeeks* [online]. [cit. 2012-02-20]. Dostupné z: <http://www.winegeeks.com/articles/93>
- [16] JACKSON, Ron S. *Wine tasting: a professional handbook*. San Diego: Academic Press, c2002, 295 s. ISBN 01-237-9076-X.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] CARRASCOSA, Alfonso V., Rosario MUNOZ a Ramón GONZÁLES. *Molecular wine microbiology*. London: Elsevier, 2011, 363 s. first. ISBN 978-0-12-375021-1.
- [20] 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.
- [21] TSAKALIDOU, Effie. *Stress responses of lactic acid bacteria*. New York: Springer, 2011. ISBN 978-038-7927-701.
- [22] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. Masarykova univerzita Brno, 2007 s. 250.
- [23] LONVAUD-FUNEL, Aline. *Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1999, no. 76, s. 317-331.
- [24] 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.
- [25] BOU, Magali, et al., *Malolactic fermentation in wine: understanding the science and the practice*. Montréal: Lallemand, 2005. ISBN 09-739-1470-X.

- [26] GARCÍA- RUIZ, Almudena, M. Victoria MORENO-ARRIBAS, Pedro J. MARTÍN-ÁLVAREZ a Begona BARTOLOMÉ. *Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of enological lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology.* 2011.
- [27] LONVAUD-FUNEL, A. *Microbiology of the malolactic fermentation : Molecular cts.* FEMS Microbiology Letters. 1995, 126, s. 209-214
- [28] MAICAS, Sergi, Angels NATIVIDAD, Sergi FERRER a Isabel PARDO. *Malolactic fermentation in wine with high densities of non-proliferating Oenococcus oeni.* World journal of microbiology and biotechnology.
- [29] BAUER, R. a L.M.T. DICKS. *Control of Malolactic Fermentation in Wine.* Department of Microbiology. 2004 (č. 25).
- [30] Malolactic Fermentation. *Www.brsquared.org/wine* [online]. Copyright Ben Rotter 2002-2008 [cit. 2012-02-07]. Dostupné z: <http://www.brsquared.org/wine/Articles/MLF/MLF.htm>
- [31] VOLSCHENK, H., H.J.J. van VUUREN a M. VILJOEN-BLOOM. *Malic Acid in Wine: Origin, Function and Metabolism during Vinificatio.* S. Afr. J. Enol. Vitic. 2006, č. 2.
- [32] LONVAUD-FUNEL, Aline. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. FEMS microbiology letter:ELSEVIER. 2001.
- [33] SMIT, A. Y., W. J. du TOIT a M. du TOIT. *Biogenic Amines in Wine: Understanding the Headach.* S. Afr. J. Enol. Vitic. 2008, Vol.29, No. 2.
- [34] RENOUF, Vincent a Patric LUCAS. BIOGENIC AMINES: AVOID SPONTANEOUS ML. *LAFFORT: I'cenologie par nature.* 2010.
- [35] ANCÍN-AZPILICUETA, C., GONZÁLEZ-MARCO, A., JIMÉNEZ-MORENO, N., *Current Knowledge about the Presence of Amines in Wine.* Critical Review in Food Science and Nutrition, 48: 3, p.257-275
- [36] PEÑA-GALLEGO, A., HERNANDEZ-ORTE, P., CACHO, J., FERREIRA, V. *Biogenic amine determination in wines using solid-phase extraction: A comparative study.* Journal of Chromatography A. 2009: 1216, p.3398-3401

- [37] DADÁKOVÁ, E., KŘÍŽEK, M., PELIKÁNOVÁ, T. *Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC)*. Food Chemistry 2009: 116, p. 365-370
- [38] SUN, X., YANG, X., WANG, E. *Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis with pulsed amperometric detection*. Journal of Chromatography A 2003: 1005, p. 189-19
- [39] FUGELSANG, K a Charles G EDWARDS. *Wine microbiology: Practical applications and procedurs*. 2nd ed. /. New York, NY: Springer, c2007, 393 s. ISBN 03-873-3349-5.
- [40] BERNARDEAU, M., VERNOUX, J.P., HENRI-DUBERNET, S., GUÉGUEN, M. *Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactobacillus genus*. International Journal of Food Microbiology, 2008, vol. 126, s. 278-285
- [41] STILES, M.E., HOLZAPFEL, W.H. *Lactic acid bacteria in foods and their current taxonomy*. International Journal of Food Microbiology, 1997, vol. 36, s. 1-29.
- [42] HUTKINS, Robert Wayne. *Microbiology and technology of fermented foods*. [s.l.] : Blackwell Publishing, 2006. 473 s. Illustrated. ISBN 0813800188.
- [43] SALMINEN, Seppo. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 4th ed. Boca Raton: Taylor, 2012. ISBN 978-143-9836-774.
- [44] GORNER, Fridrich, VALÍK, Lubomír. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1. vydanie. Bratislava : Malé centrum, 2004. s. 129-131.
- [45] MARQUES, Ana P., Ana J. DUARTE, Lélia CHAMBEL, Maria F. TEIXEIRA, Maria V. SAN ROMAO a Rogério TENREIRO. *Genomic diversity of Oenococcus oeni from different winemaking regions of Portugal*. International Microbiology. 2011.
- [46] 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.

- [47] SHARAFI, SM, I. RASOOLI a K. BEHESHTI-MAAL. *Isolation, characterization and optimization of indigenous acetic acid bacteria and evaluation of their preservation methods*. Iranian journal of microbiology. 2010.
- [48] MILLER, Mike. *Wine from the Inside Out: Easy Wine Chemistry for the Casual Chemist*. [online]. 2009[cit. 2012-02-15]. Dostupné z: <http://accuvin.com/Monitoring%20Acids%20and%20pH%20in%20Winemaking.pdf>
- [49] FLEET, Graham H. *Wine yeasts for the future*. *FEMS Yeast Research*. 2008, roč. 8, č. 7, 979-995. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x>
- [50] MALFEITO-FERREIRA, Manuel. *Yeasts and wine off-flavours: a technological perspective*. *Annals of Microbiology*. 2011, roč. 61(č. 1), 95-102. DOI: 10.1007/s13213-010-0098-0. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s13213-010-0098-0>
- [51] AYDOGDU, Halide. MICROFUNGI AND MYCOTOXINS OF GRAPES AND GRAPE PRODUCTS. *Trakia journal of sciences: The scientific serial of the Trakia University / Trakia University; Ed. Veselina Gadjeva, Eng. ed. Joseph C. Idigo*. 2009, č. 7. ISSN 1313-3551.
- [52] RASPOR, Peter, Damjana MIKLIČ-MILEK, Martina AVBELJ a Neža ČADEŽ. *Biocontrol of Grey Mould Disease on Grape Caused by Botrytis cinerea with Autochthonous Wine Yeast*. *Food technology and biotechnology*. 2010. ISSN 1330-9862.
- [53] Vilém Kraus, Jiří Kopeček: *Setkání s vínem*. druhé vydání Praha: Radix 2004. 158 s. ISBN 80-86031-36-5
- [54] *NEDOSTATKY, VADY A NEMOCI VÍN*. [online]. [cit. 2012-02-24]. Dostupné z: <http://vino.lbc.cz/vady.htm>
- [55] DHARMADHIKARI, Murli. *Lactic Acid Bacteria and Wine Spoilage\**. Iowa State University Extension and Outreach Iowa State University Extension and Outreach: Midwest Grape and Wine Industry Institute [online]. [cit. 2012-02-13]. Dostupné z:



- <http://www.extension.iastate.edu/Wine/Resources/lacticacidbacteriaandwinespoilage.htm>
- [56] BAKER, Helena. *Běžné vady vína: Jak odhalit vadu ve víně a reklamovat špatnou láhev*. [online]. [cit. 2012-02-24]. Dostupné z: [http://www.bakerwine.cz/index.php?action=show\\_content&content\\_id=8&lang=](http://www.bakerwine.cz/index.php?action=show_content&content_id=8&lang=)
- [57] *Nemoci a vady vína*. [online]. 2008 [cit. 2012-02-24]. Dostupné z: <http://vebr.webnode.cz/o-vine/nemoci-a-vady-vina/>
- [58] ŠILHÁNKOVÁ, L., DEMNEROVÁ, K. *Návody pro laboratoře z mikrobiologie*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 1993. s. 93-103.
- [59] FROLKOVÁ, Petra. *Bakterie v procesu výroby vína* [online]. 2008 [cit. 2012-04-21]. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Ludmila Tvrzová. Dostupné z: [http://is.muni.cz/th/123984/prif\\_m/](http://is.muni.cz/th/123984/prif_m/).
- [60] VALICOVÁ, Markéta. *Mikrobiologie vína: Microbiology of wine*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2009. Bakalářská práce.
- [61] BUTKOVIČOVÁ, Adéla. *Antibakteriální účinky monoacylglycerolů v podmínkách in vitro a v přírodních ovocných šťávách*. Zlín, 2010. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.
- [62] MANTLOVÁ, Gabriela. *Dekarboxylázová aktivita bakterií izolovaných z přírodních sýrů*. Zlín, 31.5.2010. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce doc. Rndr. Leona Buňková, PhD.
- [63] BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Michaela HLOBILOVÁ, Vladimír DRÁP a Stanislav KRÁČMAR. *Komparace různých metod detakce dekarboxylázové aktivity u bakterií mléčného kvašení*. Potravinářstvo [online]. 2010, roč. 4 [cit. 2012-04-21]. Dostupné z: [http://www.potravinarstvo.com/dokumenty/mc\\_februar\\_2010/pdf/4/Bunkova.pdf](http://www.potravinarstvo.com/dokumenty/mc_februar_2010/pdf/4/Bunkova.pdf)
- [64] HLOBILOVÁ, Michaela. *Srovnání metod pro detekci biogenních aminů u bakterií mléčného kvašení*. Zlín, 5.9.2009. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Leona Buňková.

- [65] LEPEŠKOVÁ, Ivana. *Biogenní aminy ve víně*. ÚZEI, Agronavigátor [online]. 20.12.2002[cit. 2012-04-21]. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=158&ch=13&typ=1&val=10747>
- [66] FOJTÍKOVÁ, Lenka. *Sledování biogenních aminů ve vybraných odrůdách vín*. Zlín, 19.5.2010. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Ing. Pavel Valášek, CSc.
- [67] KVASNIČKOVÁ, Alexandra. *Biogenní aminy v červeném vínu*. ÚZEI, agronavigátor[online]. 11.5.2011[cit. 2012-04-21]. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=152&ch=13&typ=1&val=110499>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BMK	Bakterie mléčného kvašení
BOK	Bakterie octového kvašení
BA	Biogenní aminy
JMK	Jablečno-mléčné kvašení
G-	Gramnegativní
G+	Grampozitivní
PCA	Plate count agar
AGA	Acetobacter-gluconobacter agar
AA	Acetobacter agar
TJA	Tomato juice agar

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obr. 1. Znázornění vzájemných účinků všech čtyř parametrů na JMK. [25] .....</i>	<i>27</i>
<i>Obr. 2. Ukázka růstu kolonií izolovaných ze vzorků vín na půdách TJA, AGA a MRS .....</i>	<i>60</i>
<i>Obr. 3. Ukázka růstu kolonií izolovaných ze vzorků vín na půdách MI7, AA a PCA .....</i>	<i>60</i>
<i>Obr. 4. Ukázka růstu čistých kultur bakterií izolovaných z vín. ....</i>	<i>74</i>
<i>Obr. 5. Ukázka růstu čistých kultur bakterií izolovaných z vín. ....</i>	<i>75</i>
<i>Obr. 6. Ukázka pozitivní a negativní dekarboxylázové reakce v médiu s aminokyselinou a pH indikátorem. ....</i>	<i>75</i>

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1</i> Výčet bakterií mléčného kvašení [24] .....	22
<i>Tab. 2</i> Vliv metabolismu BMK na smyslový profil vína. [31] .....	25
<i>Tab. 3.</i> Vzorky vín odebrané z vany 4; inokulované – Lalvin 31 <i>Oenococcus oeni</i> .....	41
<i>Tab. 4.</i> Vzorky vín odebrané z vany 3; inokulované – Lalvin 31 <i>Oenococcus oeni</i> .....	42
<i>Tab. 5.</i> Vzorky vín odebrané z vany 5; inokulované: BioStart .....	42
<i>Tab. 6.</i> Analyzované vzorky získané od prvního vinaře .....	43
<i>Tab. 7.</i> Analyzované vzorky vína získané od druhého vinaře .....	44
<i>Tab. 8.</i> Počty vybraných skupin mikroorganismů izolovaných ze vzorků vína z vany 4 (výsledky uvedeny jako CFU/ml).....	51
<i>Tab. 9</i> Počty vybraných skupin mikroorganismů izolovaných ze vzorků vína z vany 3 (výsledky uvedeny jako CFU/ml).....	53
<i>Tab. 10</i> Počty vybraných skupin mikroorganismů izolovaných ze vzorků vína z vany 5 (výsledky uvedeny jako CFU/ml).....	54
<i>Tab. 11.</i> Počty vybraných skupin mikroorganismů izolovaných ze vzorků vína získaných od prvního vinaře (výsledky uváděny jako CFU/ml). .....	56
<i>Tab. 12</i> Počty vybraných skupin mikroorganismů izolovaných ze vzorků vína získaných od druhého vinaře (výsledky uvedeny jako CFU/ml).....	58
<i>Tab. 13</i> Morfologické znaky kmenů izolovaných z půdy PCA .....	61
<i>Tab. 14</i> Morfologické znaky kmenů izolovaných z půdy M17 .....	64
<i>Tab. 15</i> Morfologické znaky kmenů izolovaných z půdy AA .....	68
<i>Tab. 16</i> Morfologické znaky kmenů izolovaných z půdy AGA .....	71
<i>Tab. 17</i> Morfologické znaky kmenů izolovaných z půdy MRS . .....	73
<i>Tab. 18.</i> Dekarboxylace aminokyselin kmeny izolovanými na půdě PCA.....	76
<i>Tab. 19</i> Dekarboxylace aminokyselin kmeny izolovanými na půdě M17.....	78
<i>Tab. 20</i> Dekarboxylace aminokyselin kmeny izolovanými na půdě AA.....	81
<i>Tab. 21</i> Dekarboxylace aminokyselin kmeny izolovanými na půdě AGA.....	83
<i>Tab. 22</i> Dekarboxylace aminokyselin kmeny izolovanými na půdě MRS.....	85