

Vývoj obsahu vybraných dusíkatých látek v průběhu výroby vína

Bc. Veronika Konečná

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Konečná**

Osobní číslo: **T13436**

Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Technologie potravin**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Vývoj obsahu vybraných dusíkatých látek v průběhu výroby vína**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Popište význam sledování obsahu biogenních aminů.
2. Stručně charakterizujte výrobu červených a bílých vín a pokuste se vysledovat fáze, které mohou ovlivnit výskyt biogenních aminů ve finálním výrobku.
3. Stručně charakterizujte mikroorganismy, které se mohou vyskytovat ve víně (se zaměřením na ty, které mohou produkovat biogenní aminy).

II. Praktická část

1. V praktické části odebírejte vzorky nejméně tří odrůd v průběhu výroby vína.
2. U těchto vzorků stanovte obsah biogenních aminů.
3. Výsledky vyhodnoťte a formulujte závěr.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

- [1] MORENO-ARRIBAS, M a M POLO. Wine chemistry and biochemistry [online]. New York: Springer, c2009, xv, 735 p. [cit. 2014-07-02]. ISBN 9780387741185-.
- [2] JACKSON, Ron S. Wine science: principles, practice, perception [online]. 2nd ed. San Diego: Academic Press, c2000, xv, 648 p. [cit. 2014-07-02]. ISBN 01-237-9062-X.
- [3] KADLEC, Pavel. Technologie potravin II. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002, 236 s. ISBN 80-708-0510-2.
- [4] HERNÁNDEZ-ORTE, P. et al. Biogenic amines determination in wine fermented in oak barrels: Factor affecting formation. Food Research International. 2008, 41, s. 697-706 [cit. 2014-07-02].
- [5] MORET, S., SMĚLÁ, D., POPULIN, T., CONTE, L.S.: A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. Food Chemistry, 2004, s. 355-361, ISSN 0308-8146.

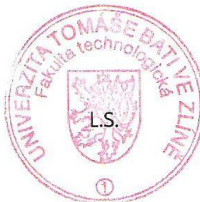
Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. František Buňka, Ph.D.**
Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce: **2. února 2015**

Termín odevzdání diplomové práce: **22. dubna 2015**

Ve Zlíně dne 2. února 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- 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. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ 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 § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 21.4.2015

Veronika Konečná

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

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

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

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

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

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

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

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-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.

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

V teoretické části diplomové práce byl popsán význam sledování obsahu biogenních aminů v potravinách. Dále byla charakterizována výroba červených a bílých vín, se zaměřením na fáze výroby, které mohou ovlivnit výskyt biogenních aminů ve finálním výrobku. Byly také stručně charakterizovány mikroorganismy, které se mohou vyskytovat ve víně, se zaměřením na ty, které mohou produkovat biogenní aminy. V praktické části diplomové práce byly odebírány vzorky několika odrůd vín v průběhu výroby vína. U těchto vzorků byl stanoven obsah biogenních aminů a také počty významných mikroorganismů. Naměřené hodnoty byly porovnány s odbornou literaturou. Bylo zjištěno, že výskyt mikroorganismů v jednotlivých fázích výroby vína ovlivňuje výsledný obsah biogenních aminů. Koncentrace těchto dusíkatých látek je také závislá na čistotě výrobních zařízení, způsobu skladování a mnoha dalších faktorech.

Klíčová slova: Víno, výroba, biogenní aminy, mikrobiologie

ABSTRACT

In the theoretical part of diploma thesis, the importance of biogenic amines monitoring in food and beverage was described. Then, manufacturing of red and white wines was characterized, focusing on phases of wine production, which may affect an occurrence of biogenic amines in the final product. Microorganisms, which may occur in wine, were characterised concisely, focusing on this microorganisms, which can product biogenic amines. In the practical part of diploma thesis, several varieties of wine during wine production were taken. The content of biogenic amines was determined, as well as the number of significant microorganisms. Measured values were compared with references. It was found the presence of microorganisms in different stages of wine production affects the final content of biogenic amines. The concentration of these nitrogen compounds also depends on the purity of production facilities, storage method and many others factors.

Keywords: Wine, production, biogenic amines, microbiology

Tímto bych chtěla poděkovat doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D., vedoucímu mé diplomové práce, za odborné vedení, věnovaný čas a cenné rady a připomínky při zpracování této práce. Dále děkuji Ing. et Ing. Ludmile Zálešákové, Bc. Veronice Kučabové a Lence Machálkové za jejich pomoc a ochotu při práci v laboratoři. Díky patří i Ing. Radce Flasarové za pomoc při zpracování výsledků, a doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za její rady v oblasti mikrobiologie. V neposlední řadě také děkuji svým nejbližším za velkou podporu během mého studia.

Motto: Víno je mezi nápoji nejušlechtilejší, mezi léky nejchutnější a mezi pokrmy nejpříjemnější.

- Plutarchos

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BIOGENNÍ AMINY	12
1.1 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ.....	12
1.2 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ.....	15
1.3 VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ.....	16
2 VÝROBA VÍNA	19
2.1 RŮST, SBĚR A PŘEPRAVA, DRCENÍ A ODZRNĚNÍ HROZNŮ.....	19
2.2 MACERACE.....	20
2.3 SCEZOVÁNÍ MOŠTU A LISOVÁNÍ RMUTU	21
2.4 SÍŘENÍ MOŠTU	21
2.5 DALŠÍ ÚPRAVY MOŠTU	23
2.6 ALKOHOLOVÉ KVAŠENÍ	23
2.7 MALOLAKTICKÉ KVAŠENÍ.....	26
2.8 SAMOČIŠTĚNÍ VÍNA, VYLUČOVÁNÍ VINNÉHO KAMENE, STÁČENÍ VÍNA Z KALŮ A ŠKOLENÍ VÍNA.....	28
2.9 ZRÁNÍ A SKLADOVÁNÍ VÍNA, LAHVOVÁNÍ.....	29
3 MIKROORGANIZMY PRODUKUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY	31
3.1 DEKARBOXYLÁZA POZITIVNÍ BAKTERIE.....	33
3.2 DEKARBOXYLÁZA POZITIVNÍ KVASINKY	34
3.3 DEKARBOXYLÁZA POZITIVNÍ PLÍSNĚ	34
II PRAKTICKÁ ČÁST	35
4 CÍL PRÁCE	36
5 METODIKA PRÁCE	37
5.1 ROZDĚLENÍ VZORKŮ.....	37
5.2 MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR.....	38
5.3 STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ.....	43
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	47
6.1 VÝSLEDKY MIKROBIOLOGICKÉHO ROZBORU.....	47
6.1.1 Výsledky stanovení u veltlínského zeleného.....	47
6.1.2 Výsledky stanovení u ryzlinku rýnského.....	50
6.1.3 Výsledky stanovení u rulandského modrého.....	52
6.1.4 Výsledky mikrobiologického rozboru komerčních vín.....	54
6.1.5 Porovnání výsledků mikrobiologického rozboru mezi víny zařazenými do sledování v průběhu výroby a komerčními víny	55

6.2	VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ	56
6.2.1	Výsledky stanovení u veltlínského zeleného.....	56
6.2.2	Výsledky stanovení u ryzlinku rýnského.....	60
6.2.3	Výsledky stanovení u rulandského modrého.....	63
6.2.4	Porovnání obsahu biogenních aminů mezi jednotlivými odrůdami.....	67
6.2.5	Porovnání obsahu biogenních aminů mezi víny zařazenými do sledování v průběhu výroby a komerčními víny	68
ZÁVĚR		71
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		72
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		94
SEZNAM OBRÁZKŮ		95
SEZNAM TABULEK.....		96
SEZNAM PŘÍLOH.....		97

ÚVOD

V dnešní době kladou lidé stále vyšší požadavky na konzumaci bezpečných a zdravých potravin a nápojů, a je tedy více než dřív důležité provádět studie zkoumající jednotlivé přítomné sloučeniny působící na zdraví lidí. Tím je umožněno sledovat sensorické i nutriční vlastnosti poživatin. Biogenní aminy ovlivňují sensorické vlastnosti poživatin. Mohou působit buď přímo, nebo mohou po požití vyvolávat ve zvýšené míře nežádoucí reakce organismu. Proto nejen ze sensorického, ale i ze zdravotního hlediska je žádoucí sledovat jejich obsah. Při produkci biogenních aminů v potravinách hraje stěžejní roli činnost mikroorganismů a podmínky při výrobě a skladování, za kterých se biogenní aminy mohou tvořit.

Tato diplomová práce popisuje ve třech kapitolách teoretické části význam sledování obsahu biogenních aminů a jejich vliv na lidský organizmus, výrobu vína se zaměřením na fáze, které mohou koncentraci biogenních aminů ovlivňovat, a také dekarboxyláza pozitivní mikroorganismy, které se přirozeně vyskytují ve všech fázích výroby vína. V dalších třech kapitolách praktické části jsou popsána vlastní stanovení přítomnosti těchto mikroorganismů a dusíkatých látek, která byla prováděna v laboratořích Ústavu technologie potravin a Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí Fakulty technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární organické látky přirozeně se vyskytující v živých systémech, které zajišťují mnoho fyziologických funkcí a vyskytují se mimo jiné také ve fermentovaných potravinách a nápojích. Vznikají především dekarboxylací aminokyselin pomocí enzymů (dekarboxyláz) mikroorganismů. V souvislosti s vínem jsou nejčastěji popisovány histamin, tyramin, putrescin a fenyletylamin. Je-li obsah biogenních aminů v potravině vysoký, mohou způsobovat přímou či nepřímou toxicitu. [1] V následujících podkapitolách bude podrobněji popsán vznik, výskyt a význam těchto látek.

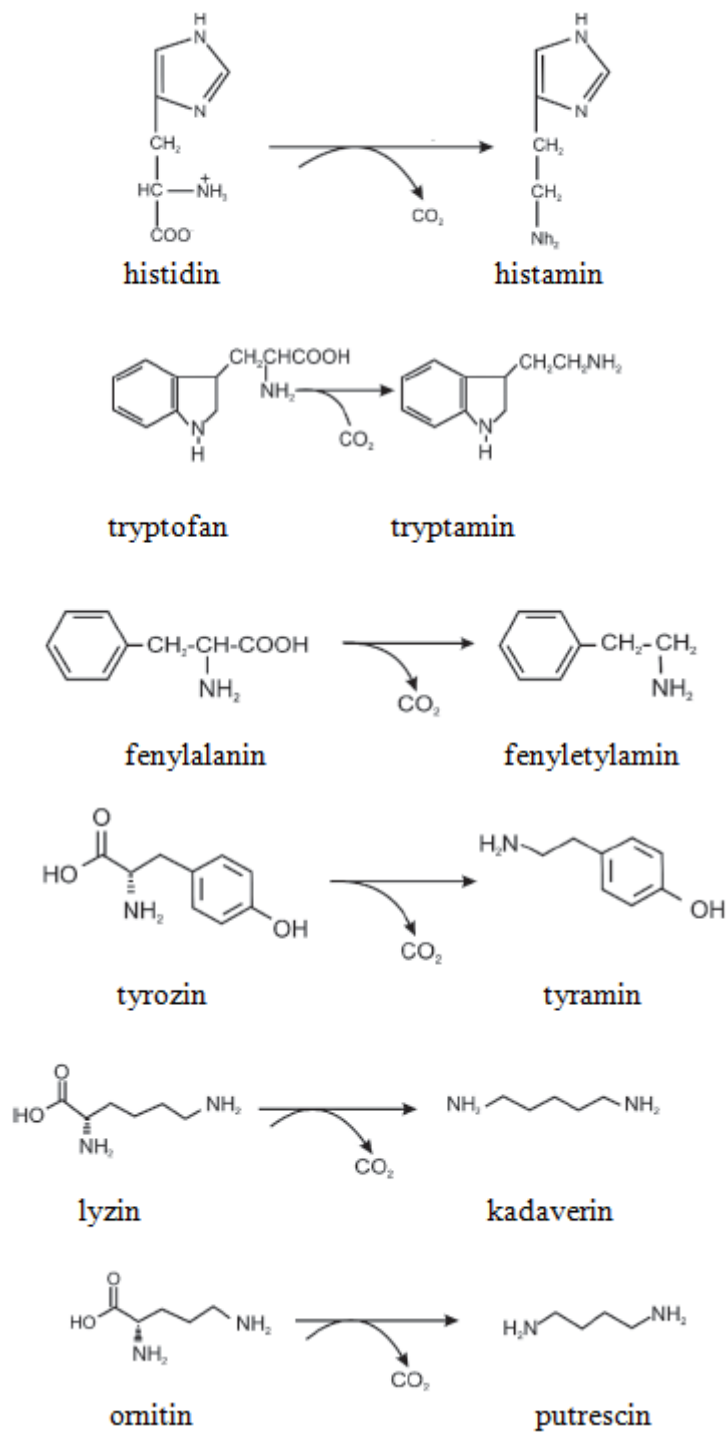
1.1 Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy jsou z volných aminokyselin produkovány dekarboxylázami mikroorganismů během výroby a skladování potravin a nápojů. [2,3,4,5,6]

Pro vznik biogenních aminů musí být dodrženy tři podmínky:

- 1) dostupnost volných aminokyselin,
- 2) přítomnost dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů,
- 3) vhodné podmínky umožňující růst bakterií a syntézu a aktivitu enzymu dekarboxyláza.

Aminokyseliny, jež jsou prekurzory aminů, v bobulích reprezentují 30 - 40 % celkového dusíku. [7] Primární reakce katabolizmu aminokyselin zahrnuje dekarboxylaci, transaminaci a deaminaci. Mnoho bakteriálních rodů je schopno takto dekarboxylovat aminokyseliny. Tato schopnost je spojena s ochranným mechanismem mikroorganismů, který umožňuje růst a přežití v kyselém prostředí, jelikož tvorbou aminů se zvyšuje pH. [3,8] Dále mohou aminy vznikat transaminací aldehydů a ketonů. [9,10] Ve víně může být dekarboxylováno několik aminokyselin, hlavně histidin, tyrozin, lyzin, ornitin a fenylalanin, dále vznikají biogenní aminy také z tryptofanu či argininu. [3,8,11] Vznik některých biogenních aminů z jejich prekurzorů je zobrazen na následujícím obrázku (obr. 1). [12]



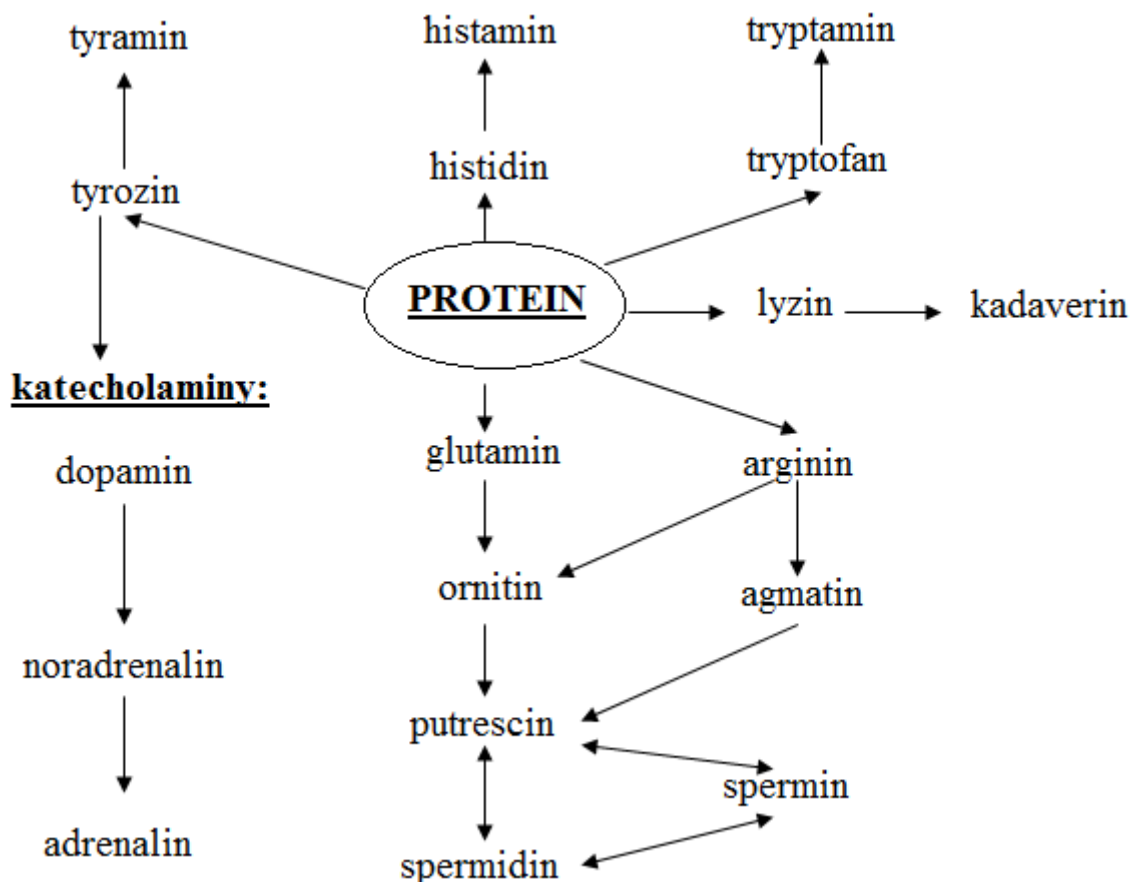
Obr. 1 - Vybrané biogenní aminy a jejich prekurzory (aminokyseliny) [12]

Pozn.: Putrescin může být ve všech buňkách syntetizován z argininu přes ornitin, v rostlinných pletivech a u gramnegativních bakterií může být syntetizován přes agmatin, který vznikl dekarboxylací argininu. Z agmatinu může dojít k přeměně přímo na putrescin nebo může reakce probíhat přes meziprodukt *N*-karbamoylputrescin. [13,14]

Biogenní aminy jsou odvozeny buď od aromatických nebo od kationických aminokyselin s jedním či více kladnými náboji. Mají hydrofobní strukturu. Podle chemické struktury se dělí na heterocyklické (histamin a tryptamin), aromatické (fenyletylamin a tyramin), alifatické (kadaverin a putrescin) a polyaminy (spermin a spermidin). [6]

Dekarboxylace příslušných aminokyselin je podmíněna přítomností specifických enzymů, tzv. dekarboxyláz. Tyto proteiny a geny, které je kódují, byly studovány u některých druhů bakterií mléčného kvašení vyskytujících se ve víně. Kofaktorem těchto dekarboxyláz je pyridoxalfosfát. Při dekarboxylaci je odbourávána karboxylová skupina aminokyseliny, dochází k odštěpení oxidu uhličitého a vzniku bazického aminu. Histidin je přeměněn na histamin pomocí histidin-dekarboxylázy (HDC, EC.4.1.1.22), tyrozin je dekarboxylován působením tyrozin-dekarboxylázy (TDC, EC.4.1.1.25) atp. Tyto enzymy patří do skupiny lyáz a štěpí vazby mezi uhlíky a mezi uhlíkem a dusíkem. [6,9,10]

Vzájemné vztahy tvorby biogenních aminů jsou zobrazeny na obr. 2.



Obr. 2 - Vzájemné vztahy tvorby biogenních aminů [15]

1.2 Výskyt biogenních aminů

Biogenní aminy jsou důležité dusíkaté sloučeniny, které jsou přirozeně tvořeny a degradovány v důsledku metabolické aktivity rostlinných, mikrobiálních i živočišných buněk. Tyto aminy můžeme nazvat endogenní. Mohou být detekovány v surovině i ve zpracované potravíně obsahující bílkoviny či aminokyseliny. Z mikrobiologického nebo biochemického hlediska bývají spojeny také s fermentačními procesy, skladováním anebo kažením. Tyto aminy pak nazýváme exogenní. [6,8,11,15,16,17,18]

Nejčastěji se biogenní aminy vyskytují v alkoholických nápojích, sýrech, fermentované zelenině či salámech, dále také v čokoládě či oříšcích. Přítomnost biogenních aminů v potravíně je důležitá nejen z toxikologického hlediska, ale je zejména u nefermentovaných potravin využívána právě i jako indikátor kažení. [2,3,4,5,19]

Ve víně se mohou biogenní aminy vyskytovat buď již v bobulích či v moštu, nebo jsou produkovány kvasinkami během alkoholového kvašení a/nebo bakteriemi během malolaktického kvašení. [6,20,21,22,23]

Existuje velká variabilita v obsahu a distribuci biogenních aminů v hroznech a ve víně. Některá vína obsahují většinu známých biogenních aminů, zatímco jiná je neobsahují. Např. v bobulích jsou nejčastěji obsaženy putrescin a spermidin, zatímco agmatin, kadaverin, spermin, histamin, tyramin a fenyletylamin jsou zde nalezeny pouze v malých množstvích. Nejčastěji se vyskytujícím aminem ve víně je histamin, tyramin a putrescin. Tryptamin a kadaverin bývají zastoupeny v mnohem menších koncentracích. [15,24,25,26,27] Podle Edera [28] se biogenní aminy ve víně vyskytují přibližně v těchto množstvích: histamin 0,1 - 12,0 mg/l v bílém a 0,1 - 28,0 mg/l v červeném vínu, tyramin 0,1 - 6,5 mg/l v bílém a 0,1 - 8,0 mg/l v červeném vínu, putrescin 0,1 - 4,8 mg/l v bílém a 0,9 - 35,0 mg/l v červeném vínu, kadaverin v bílém vínu okolo 29,0 mg/l a 21,8 mg/l ve vínu červeném, a fenyletylamin přibližně 13 mg/l v bílém a 14 mg/l v červeném vínu. Bover-Cid a kol. [29] uvádí u tyraminu, putrescinu a kadaverinu vyšší koncentrace. Celková koncentrace biogenních aminů ve víně se podle Křížka a Pelikánové [30] pohybuje v hodnotách 5 - 130 mg/l.

Aminokyselinové složení a tedy i obsah biogenních aminů v konečném produktu je dán také zeměpisnou oblastí, kde je réva pěstována. Dalšími faktory je přítomnost mikroorganismů produkujících aminy nebo podmínky během kvašení, jako je teplota, vliv pH a jeho

změn, či přístup kyslíku - viz. tab. 1. Důležitým vlivem je také ošetření moštu před kvašením, délka kvašení na slupkách, dále obsah alkoholu a koncentrace oxidu siřičitého nebo přidaných živin. [17,23,31,32] Je-li víno vyráběno z nahnílého sklizeného materiálu, vykazuje vysoké koncentrace aminů. [28] Některé z těchto vlivů způsobují v médiu zvýšení koncentrace prekurzorů, zatímco jiné podporují vývoj mikroorganismů schopných produkovat aminy. [6,21,33]

Tab. 1 - Faktory ovlivňující syntézu biogenních aminů

FAKTOR		VLIV NA OBSAH BA	ZDROJ
substrát	volné AMK	zvýšení	[26,34,35]
mikroorganismy s enzymem nezbytným ke tvorbě BA	dekarboxylázy	zvýšení	[15,36,37,38,39,40,64]
teplota	chlazení	snížení	[35,40,41,42]
pH	kyselé	zvýšení	[40,41,43,44,45]
atmosféra	aerobní prostředí	zvýšení	[38,40,41]
látky s antimikrobiálními účinky	inhibice mikroorganismů	snížení	[46]
fermentace sacharidů	acidifikace	zvýšení	[11]
enzym oxidáza	MAO, DAO	snížení	[47,48]

1.3 Význam biogenních aminů

Studium výskytu biogenních aminů bývá prováděno z důvodu možného toxikologického rizika, které hrozí, pokud je přijímána potravina obsahující zvýšené množství těchto látek nebo je konzumována citlivějšími jedinci v množství, které u zdravých jedinců nevyvolává žádné příznaky. Dále je obsah biogenních aminů sledován kvůli vztahu mezi jejich zvýšeným obsahem a kvalitou hroznů a hygienickými podmínkami během výroby vína. [6,31,49]

V nízkých koncentracích jsou biogenní aminy esenciálními sloučeninami důležitými pro mnoho fyziologických funkcí mikroorganismů, rostlin, ale i lidí a zvířat. [6,50] Patří sem regulace tělesné teploty, regulace pH a objemu žaludku nebo mozkové aktivity. [50] V lidském těle je nízký obsah biogenních aminů odbouráván na fyziologicky méně účinné produkty. Tento detoxikační systém zahrnuje specifické enzymy monoamin oxidázu

(MAO, EC.1.4.3.4), diamin oxidázu (DAO, EC.1.4.3.6) a histidin metyltransferázu (HMT, EC.1.1.2.85). [51,52,53,54] Těmito enzymy je katalyzována deaminace biogenních aminů, které jsou přeměněny na aldehyd, peroxid vodíku a amoniak. [6] MAO odbourává biogenní aminy v celém organismu, DAO a HMT jsou lokalizovány v gastrointestinálním traktu a v játrech. [55,56]

Pokud je zjištěna nedostatečná aktivita DAO, způsobená např. genetickou predispozicí (intolerance histaminu nebo nedostatek tohoto enzymu), gastrointestinálním onemocněním či inhibicí účinku DAO léky nebo alkoholem, v tomto případě ani malé množství biogenních aminů nemůže být efektivně metabolizováno. [51,52] Případně jsou-li aminy konzumovány ve vysokých dávkách, ani v tomto případě není detoxikační systém schopný dostatečně aminy eliminovat a ty pak mohou v organismu vyvolávat nežádoucí stavy jako je vyrážka, bolest hlavy, hypo- či hypertenze, nevolnost, zvracení, průjem, bušení srdce, otoky, a ve vážných případech i krvácení do mozkové tkáně až smrt. Nejvíce prostudovaným biogenním aminem je z tohoto hlediska histamin. Obecně je za dávku histaminu, která může způsobit zdravotní problémy, považována hodnota 8 - 20 mg/l, dle citlivosti jedince. Silla Santos a Önal [11,57] rozšířili tento interval až ke 40 mg/l. Jsou-li s histaminem přítomny i aminy spermin, spermidin, putrescin, kadaverin či agmatin, jsou jeho negativní účinky zesíleny. [6,26,50,51,52,58,59,60,61,62] Na druhou stranu jsou však tyto biogenní aminy zodpovědné za žádoucí inhibici oxidace polynenasycených mastných kyselin, α -tokoferolu a karotenoidních barviv v potravíně. [63]

Podle Ten Brinka [64] naopak může putrescin, kadaverin a tyramin metabolismus histaminu inhibovat.

Zmíněná toxikologická rizika záleží na citlivosti jedince, na celkové koncentraci biogenních aminů, na množství souběžně konzumovaného alkoholu anebo drog, ale je také rozdílná i mezi aminy samotnými. [6,26] Pro porovnání rozdílnosti mezi jednotlivými aminy může být jako příklad vzat tyramin a fenyletylamin. Koncentrace tyraminu, která může způsobit zdravotní komplikace, se podle Souflerose a kol. [26] pohybuje v rozmezí od 25 do 40 mg/l. Hodnota fenyletylaminu, od níž mohou vznikat zdravotní problémy, je oproti tomu až desetinásobně menší, a to pouhé 3 mg/l. [26]

Některé biogenní aminy a jejich účinky na lidské tělo jsou uvedeny v tab. 2. [1,6,15,50,51,52,58,59,60,61]

Tab. 2 - Vybrané biogenní aminy a jejich účinky [1,6,15,50,51,52,58,59,60,61]

AMK	BA	FYZIOLOGICKÝ EFEKT
histidin	histamin	uvolňuje adrenalin a noradrenalin
		ovlivňuje hladké svalstvo dělohy, střev a dýchacích cest
		stimuluje senzorické a motorické neurony
		řídí sekreci žaludečních kyselin
tyrozin	tyramin	zužuje periferní cévy
		zvyšuje srdeční výdej
		způsobuje slzení a slinění
		zrychluje dýchání
		zvyšuje hladinu cukru v krvi
		uvolňuje noradrenalin
		způsobuje migrénu
ornitin a lyzin	putrescin a kadaverin	hypotenze
		bradykardie
		způsobují potenciální toxicitu jiných aminů ovlivněním detoxikačních reakcí
		hnilobné aroma vína
		reakcí putrescinu s dusitany vznikají karcinogenní nitrosaminy
fenylalanin	β -fenyletylamin	uvolňuje noradrenalin
		hypertenze
		způsobuje migrénu
tryptofan	tryptamin	hypertenze

Do roku 2002 obsahovala česká legislativa limity pro vybrané biogenní aminy v rybách, sýrech, pivu a vínu. Byly stanoveny vyhláškou č. 298/1997 Sb. Pro víno byl stanoven limit 20 mg/l histaminu a 50 mg/l tyraminu pro červená vína. V současnosti pro žádný biogenní amin obsažený ve víně legislativní limity v České republice ani v Evropské unii stanoveny nejsou, některé státy na doporučení studie podle Marquese a kol. [65] zavedly své vlastní „limity“ na obsahy aminů, hlavně histaminu. Tyto země se snaží omezovat dovoz vín na jejich území, z toho důvodu, že výskyt aminů může být také ekonomickým rizikem. Jedná se např. o Rakousko nebo Švýcarsko (odmítají vína s obsahem histaminu nad 10 mg/l), mírnější limity má např. Německo, Holandsko, Belgie a Francie. [66,67,68]

2 VÝROBA VÍNA

Réva vinná (latinsky *Vitis vinifera* L.) je rostlina z čeledi révovitých, která se dále dělí na dva poddruhy, a to na ušlechtilou révu vinnou pravou neboli evropskou (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera* syn. ssp. *sativa*) a révu lesní (tzv. divoká forma) *Vitis vinifera* L. ssp. *sylvestris*. [69]

Rékové víno je výrobek, který byl získán výhradně úplným nebo částečným alkoholovým kvašením čerstvých, rozdrcených nebo nerozdrcených vinných hroznů nebo hroznového moštu. [8]

V této kapitole bude popsána výroba vína se zaměřením na fáze, které mohou ovlivňovat výskyt biogenních aminů v konečném produktu.

2.1 Růst, sběr a přeprava, drcení a odzrnění hroznů

Již na hroznech je možno nalézt menší množství bakterií mléčného kvašení (do 10^2 KTJ/g). Počet octových bakterií a kvasinek je vyšší. [70] Bakterie octového kvašení dosahují na zralých bobulích počtu okolo 10^2 KTJ/g, na poškozených bobulích až 10^5 KTJ/g. [71] Kvasinky se na bobule dostávají z půdy, ale i pomocí větru a hmyzu. Při zrání bobulí převládá druh *Kloeckera apiculata*, dále je zde možno nalézt kvasinky rodů *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Debaromyces* spp., *Hansenula* spp., *Issatchenikia* spp., *Kluyveromyces* spp., *Metschnikowia* spp., *Pichia* spp. a *Rhodotorula* spp.. *Saccharomyces cerevisiae* a *S. bayanus* jsou přítomny pouze v omezeném množství. [72] Jejich počet se na povrchu bobulí pohybuje v řádech 10^6 KTJ/g. [73]

Také některé biogenní aminy jsou přítomny již v hroznech. Téměř vždy je to putrescin a spermidin. Jedná se o přirozený výskyt z důvodu funkce spermidinu a také sperminu v metabolismu nukleových kyselin, kdy je putrescin těmito polyaminům prekurzorem. Jejich obsah je dán odrudou, typem a složením půdy, klimatickými podmínkami během růstu a výživou. Těmito faktory je ovlivněn růst dekarboxyláza pozitivní mikroflóry. [3,28,59,74,75,76] Nedostatek vody během růstu podle Bover-Cida a kol. [29] vliv na zvýšený obsah aminů v hroznech a víně nemá.

Jsou-li bobule při sběru nahnílé nebo jinak poškozené, je vyšší pravděpodobnost výskytu vysokého obsahu biogenních aminů ve finálním výrobku. [28] V tomto případě je nutno je převézt rychle, šetrně a za nízkých teplot tak, aby nedošlo k dalšímu mechanickému poško-

zení při přepravě, a ihned zpracovat, aby nedocházelo k přemnožení mikroflóry nebo k zapaření hroznů. [11,77,78,79,80,81,82,83] Při vhodné teplotě a vlhkosti totiž může dojít k růstu plísní, znehodnotit bobule může především rod *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Botrytis* spp., *Cladosporium* spp., *Eurotium* spp., *Penicillium* spp. a *Rhizopus* spp. V důsledku jejich růstu může docházet k produkci jejich sekundárních metabolitů - mykotoxinů. [84]

Drcení (rmutování) je prováděno v mlýncích, většinou současně dochází i k odzrnění, vzniká rmut. [77,78,79,80,81,82,83,182] Po rozdrcení hroznů a také ještě během prvních několika dní alkoholového kvašení dojde ke zvýšení počtu bakterií mléčného kvašení řádově až k 10^4 KTJ/g. Jedná se zejména o druhy *Lactobacillus casei*, *Lb. plantarum*, a také *Oenococcus oeni* a *Pediococcus cerevisiae*. [70,85] Z kvasinek je možno v moštu nalézt především rody *Hansenula* spp. a *Kloeckera* spp.. Kvasinky *Saccharomyces* se v tomto prostředí začínají rozmnožovat, a po 3 - 4 dnech převládají. [72]

Výskyt aminů je obecně ovlivněn hygienickými podmínkami, ve kterých dochází ke kontaktu hroznů či moštu s nádobami a zařízeními, ať už při sklizni, přepravě, zpracování hroznů nebo enologickém ošetřování vína. [59,86,87] Špatné hygienické podmínky jsou příčinou výskytu zvýšeného množství mikroorganismů (vedle bakterií mléčného kvašení také plísní či octových bakterií) a vzniku vyššího množství aminů. [6,11]

2.2 Macerace

Macerace bývá prováděna u červených vín při 10 - 15°C maximálně 8 dní, zkrácená macerace (několik hodin) pak i u aromatických bílých odrůd, jako je ryzlink rýnský, sauvignon apod. [77,78,182]

Dobou ležení moštu na slupkách není ovlivněno pouze větší množství mikroorganismů a extrakce fenolických látek a barviv z hroznů, ale také extrakce jiných látek, jako jsou proteiny, polysacharidy a samozřejmě také aminokyseliny, které jsou prekurzory biogenních aminů. Je tedy důležitá i znalost tohoto vlivu. S delší dobou macerace silně narůstá koncentrace biogenních aminů, zejména histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu. [6,77,78,80,88] Na druhou stranu však mohou extrahované fenolické látky reagovat s přítomnými aminokyselinami, což sníží jejich obsah a tím také riziko vzniku biogenních aminů. [6]

Pro zvýšení extrakce žádaných látek mohou být při nižších teplotách přidávány komerční pektolytické enzymy. Výhodami použití těchto látek je také zvýšení výtěžnosti při lisování, a lepší čiření vína. Nevýhodou však je, že tyto enzymy mohou vytvářet nežádoucí enzymatickou aktivitu, jejímž působením může být následně zvýšen obsah volných aminokyselin, tedy prekurzorů biogenních aminů. [6]

2.3 Scezování moštu a lisování rmutu

Scezování je oddělení nejkvalitnějšího podílu moštu, tzv. samotoku. Je prováděno spíše ve větších podnicích, které disponují zařízením pro scezování. Tím, že mošt neprotéká přes lis, je méně vystaven oxidaci. Scezování by mělo být uskutečněno krátce před lisováním. Díky vzniklým provzdušněným „kanálkům“ ve rmutu je sice podpořeno rozmnožení kvasinek, ale dochází také k nárůstu nežádoucích mikroorganismů, hlavně aerobních octových bakterií. [19,77,78] Z celkového výtěžku moštu připadá na samotok 40 - 60 %. [81,182]

Zbylý mošt je od matolin odstraňován využitím tlaku. Lisování může být prováděno jako plynulé nebo přerušované, existuje také více způsobů vytváření tlaku (mechanicky, hydraulicky atd.). Odtok moštu je usnadněn „kanálky“, které vznikly během scezování nebo přepravy rmutu do lisovacího zařízení. Doliskem (využití vyššího tlaku, který poškodí slupku a přítomné pečičky, a je vyluhováno více tříslovin, barviv a minerálních látek) je získáno 10 % z celkové výtěžnosti moštu. [77,78]

Typické pH hroznového moštu se podle Hearda a Fleeta [181] pohybuje v rozmezí od 2,75 do 4,20. Tyto hodnoty nemají negativní efekt na růst kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Počet všech druhů kvasinek v moštu bývá v rozmezí od 10^3 do 10^5 KTJ/g. [89,90]

2.4 Síření moštu

Podle některých autorů není po síření tvorba aminů během alkoholového kvašení nijak ovlivněna. [91] Podle Garde-Cerdána a kol. [92] se však jedná o nejvýhodnější způsob eliminace tvorby biogenních aminů. Sířením jsou potlačeny nebo inhibovány nejen dekarboxyláza pozitivní mikroorganismy (viz. kapitola 3), utlumeny oxidační enzymy, je vyvážen vzdušný kyslík a podpořena tvorba glycerolu při alkoholovém kvašení. Glycerol zvyšuje obsah bezcukerného extraktu a takto vyrobená vína mají plnou chuť. [77,92,182]

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* zodpovědné za alkoholové kvašení jsou odolnější vůči oxidu siřičitému než většina jiných druhů kvasinek. Použitím síření tedy dochází k podpoření jejich vývoje vůči jiným druhům [93,94], a je také podpořena extrakce fenolických sloučenin. [95]

Oxid siřičitý je tradiční antimikrobiální činidlo a antioxidant využívaný ve sklepích. Je využíván k inhibici kvasinek a bakterií nechtěných v pozdějších fázích výroby vína (např. zrání), a také po ukončeném malolaktickém kvašení. [6,25,78,91] Principem je přidání disiřičitanu draselného (tzv. pyrosulfitu) nebo siřných plátů do kyselého prostředí (rov. 1) [11,77]:



Vzniklý oxid siřičitý dále reaguje s vodou (rov. 2) [77]:



I po síření jsou v moštu obsaženy různé druhy kvasinek, jako *Kloeckera* spp., *Candida* spp., *Pichia* spp., *Metschnikowia* spp. a *Saccharomyces cerevisiae*, v pořadí jejich přítomnosti na začátku, uprostřed a na konci alkoholového kvašení, tedy i podle jejich odolnosti k obsahu etanolu. [89,96] Sířením tedy nelze zastavit úplně všechny enzymatické reakce, podle některých studií byl také na konci malolaktického kvašení i po zvýšení obsahu SO_2 zjištěn mírný nárůst obsahu histaminu. [6,25,91] Pro zvýšení účinku síření je možno přidat také enzym lysozym, který lyzuje grampozitivní bakterie, mezi které patří právě bakterie mléčného kvašení. [97]

Zdravé mošty se síří na koncentraci 20 - 40 mg SO_2 na litr [182]. Z výzkumu podle Vidal-Caroua a kol. [20] bylo zjištěno, že červená vína s obsahem SO_2 40 mg/l obsahovala více tyraminu (8 mg/l) než histaminu (2 mg/l), zatímco tento poměr se změnil (4 mg/l ku 7 mg/l), pokud byla sulfítace zvýšena na 85 mg/l. Podle Bauzy a kol. [98] koncentrace SO_2 vyšší než 100 mg/l rapidně snížila tvorbu všech biogenních aminů.

Povolená množství přidaného SO_2 jsou uvedena v Nařízení Komise (ES) č. 606/2009, kterým se stanoví některá prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 479/2008, pokud jde o druhy výrobků z révy vinné, enologické postupy a omezení, která se na ně použijí. [99] Při nadměrných dávkách může docházet k organoleptickým změnám a k dráždivým vlivům zejména na horní cesty dýchací. Vzhledem k těmto účinkům je v posledních letech tenden-

ce snižovat přípustné limity. I když není dosud známa žádná látka, jež by SO₂ mohla ve všech jeho enologických vlastnostech nahradit, jsou hledány jiné konzervační látky, které nepoškozují zdraví a mohou nahradit nebo částečně doplnit činnost sníženého množství tohoto konzervačního činidla (např. nisin). [6]

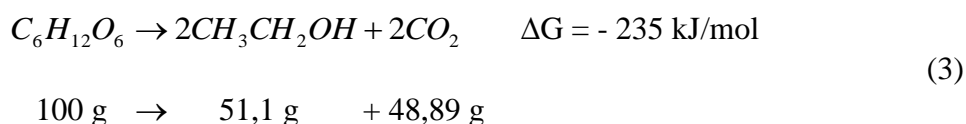
Síření se obvykle neprovádí po alkoholovém a před malolaktickým kvašením, byl by inhibován růst bakterií mléčného kvašení. [100]

2.5 Další úpravy moštu

Mezi další úpravy moštu je zahrnuto doslazování, které je omezeno Nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013 ze dne 17. prosince 2013, kterým se stanoví společná organizace trhů se zemědělskými produkty a zrušují nařízení Rady (EHS) č. 922/72, (EHS) č. 234/79, (ES) č. 1037/2001 a (ES) č. 1234/2007, a Prováděcím nařízením Komise (EU) č. 1271/2014 ze dne 28. listopadu 2014, kterým se povoluje zvýšit mezní hodnoty obohacování vína vyrobeného z vinných hroznů některých moštových odrůd sklizených v roce 2014 v některých vinařských oblastech nebo jejich části. Dále se může provádět odkyselování či okyselování a odkalování. Odkalování je prováděno staticky nebo filtrací, a dochází k oddělení kalů a nečistot, které by mohly být nositeli nežádoucí mikroflóry. [77,78,102,103]

2.6 Alkoholové kvašení

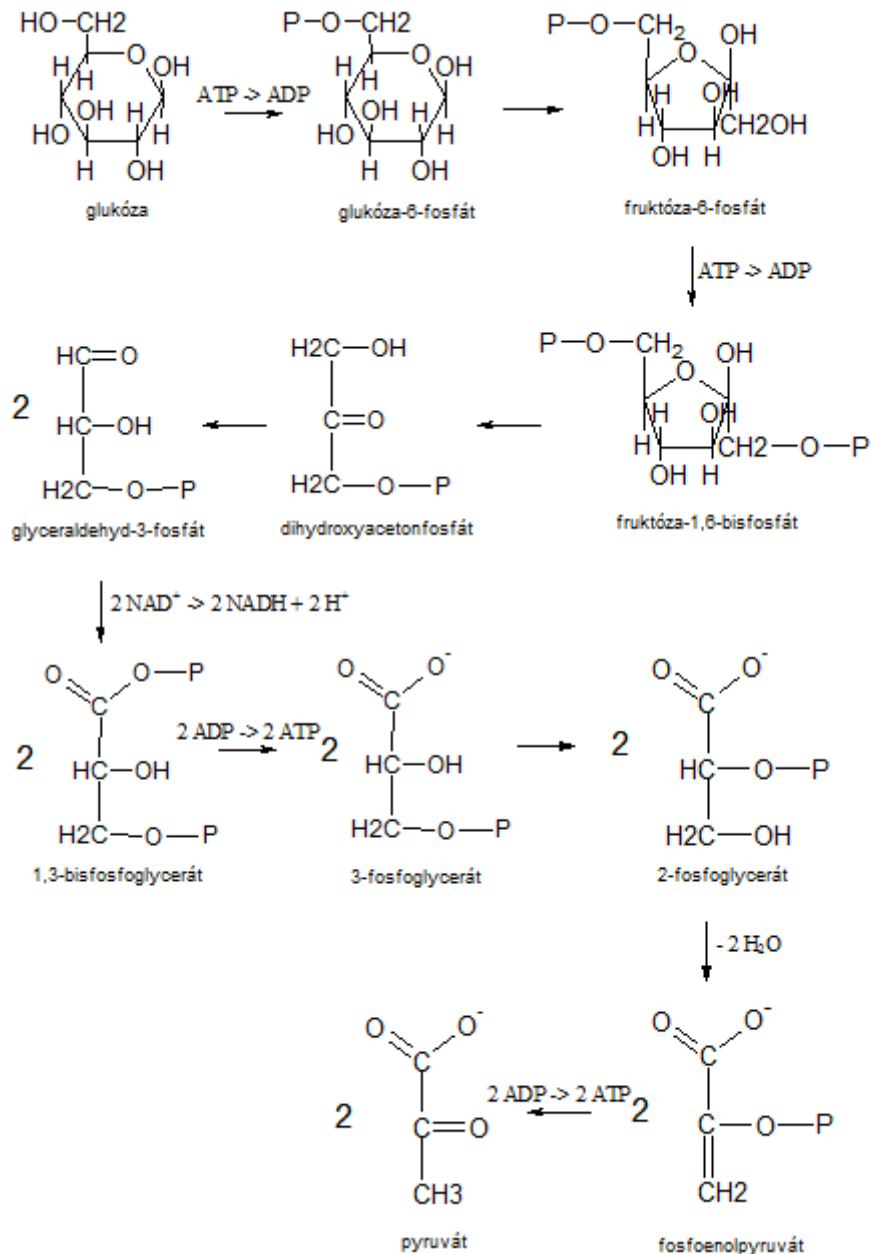
Alkoholové kvašení (rov. 3) je anaerobní přeměna cukrů (hlavně glukózy a fruktózy) na etanol a oxid uhličitý. [104]



Pozn.: Ve skutečnosti nevzniká ze 100 g glukózy 51,1 g etanolu, ale jen 47 - 48 g. Kromě etanolu totiž vznikají i jiné produkty, které jsou zmíněny dále v této kapitole. [77]

Katabolizmus glukózy (a fruktózy) je uskutečňován během glykolýzy, kdy dochází k jejich přeměně na dvě molekuly pyruvátu, k regeneraci NAD⁺, a zároveň se uvolňuje energie ve formě dvou molekul ATP. Tato přeměna je také nazývána jako Embden-Meyerhoff-Parnasova (EMP) dráha, viz. obr. 3. [78,105] Pyruvát je poté enzymaticky transformován

na etanal a oxid uhličitý, etanal dále redukován na etanol. [106] Obě vzniklé látky jsou pak transportovány ven z buňky prostou difuzí. [6]



Obr. 3 - Schéma glykolýzy [107,108]

Pozn.: V případě metabolismu fruktózy dochází k fosforylaci fruktózy rovnou na fruktóza-6-fosfát, vstup fruktózy do glykolytické dráhy tedy obsahuje jen jeden reakční stupeň. [104]

Alkoholové kvašení je komplex mnoha biochemických, chemických a fyzikálně-chemických dějů. [6] Je vyvoláváno především přítomností kvasinek nebo některých bakte-

rií. [6,63,109] Podílí se na něm především kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae*, ale i rody *Brettanomyces* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Debaryomyces* spp., *Hanseniaspora* spp., *Kluyveromyces* spp. ad. [110] Jejich počet během kvašení se pohybuje až okolo 10^8 a 10^9 KTJ/g, po skončení alkoholového kvašení klesá počet kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* na méně než 10^2 KTJ/g. [73,90,96] Průběh alkoholového kvašení je ovlivněn teplotou při kvašení, obsahem cukru a SO_2 v moštu, vznikajícím CO_2 , předchozím odkalením, koncentrací etanolu, a mnoha dalšími faktory. [11] Vzniká mnoho dalších látek, jako jsou vyšší alkoholy, estery, glycerol, diacetyl, acetoin, kyselina octová, jantarová či sukcinová ad. Je tvořen také buket vína. [6,77] Koncentrace etanolu v suchých bílých a červených vínech se pohybuje mezi 8 a 16 obj. %. [111,112] Počet mléčných bakterií během alkoholového kvašení klesá řádově na hodnotu 10^2 KTJ/g, během rozvoje malolaktického kvašení však jejich počet začne opět růst. [85,70,73]

Dle Moreno-Arribase a Pola a dalších autorů [6,20,21,22,23] jsou biogenní aminy produkovány právě i kvasinkami během alkoholového kvašení. Oproti tomu podle Herberta a kol. a van Schothorsta [74,91] nebyl studii během alkoholového kvašení prokázán výraznější nárůst obsahu biogenních aminů se závěrem, že kvasinky většinou nejsou zodpovědné za produkci aminů.

Nejčastěji prezentovaným názorem je, že kvasinky produkují během alkoholového kvašení méně významné množství biogenních aminů než bakterie mléčného kvašení při kvašení malolaktickém. Bylo také zjištěno, že dekarboxylačním působením kvasinek jsou produkovány jiné aminy než mléčnými bakteriemi. V současnosti však nejsou biochemické procesy ani geny kódující enzymatickou přeměnu na aminy a regulaci jejich tvorby u kvasinek známy tak dobře jako u bakterií mléčného kvašení. [6,78] Nicméně je známo, že jakmile jsou kvasinky na konci alkoholového kvašení autolyzovány, jsou zdrojem volných aminokyselin v následujícím malolaktickém kvašení a při stárnutí vína. Autolýzou kvasinek je tedy podporován růst a aktivita bakterií mléčného kvašení, protože jsou při ní uvolňovány vitaminy a mnoho dusíkatých sloučenin. Bakterie mléčného kvašení využívají tyto živiny a zdroje energie, a mohou tak snadněji hydrolyzovat a metabolizovat další proteiny a peptidy na aminokyseliny. [113,114,115,116,117]

Bylo zjištěno, že použitím selektovaných čistých kultur kvasinek je zabráněno kvašení nežádoucím směrem, prokvašení je důkladné a dochází k nižší produkci nežádoucích vedlejších látek, tedy i biogenních aminů. Tato vína mají unifikované složení. [77,118,119,120]

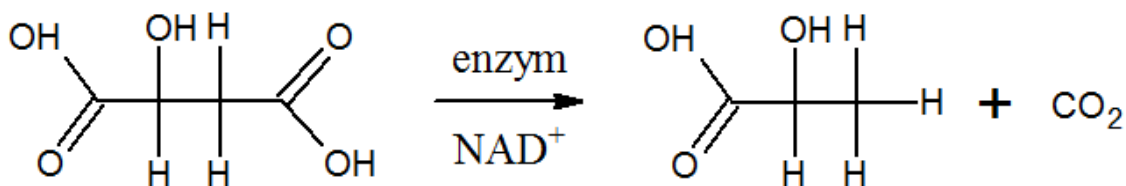
2.7 Malolaktické kvašení

Většina biogenních aminů vzniká díky enzymům mléčných bakterií během malolaktického kvašení. Bakterie mléčného kvašení jsou v nízkých koncentracích přítomny již na bobulích, a během zpracování se rychle rozvíjejí. [6,120] Jakmile se jejich počet začne pohybovat okolo 10^6 KTJ/g, mléčné bakterie začnou spotřebovávat zejména hexózy, které nebyly zcela zkvašeny kvasinkami při alkoholovém kvašení, a nastává kvašení malolaktické. [85]

Malolaktické kvašení (jablečno-mléčné kvašení) je biologické odbourávání kyselin ve víně, kdy je jablečná kyselina přeměněna enzymatickou dekarboxylací na méně chuťově agresivní kyselinu mléčnou a oxid uhličitý (obr. 4). [6,77,121,122] Jedná se o tzv. sekundární kvašení nastávající obvykle na konci nebo před ukončením alkoholového kvašení, které je žádoucí u více kyselých vín. [78,121,123,124,125] Jde o enzymatickou reakci, kdy je pomocí malolaktického enzymu (MLE) nejprve dekarboxylována jablečná kyselina na pyrohroznovou, a ta je poté redukována na mléčnou kyselinu. [78,85,126,127] Následně je tato kyselina společně s protony transportována z buňky. Vně přítomné protony jsou pak dostatečným pohonem k uskutečnění oxidativní fosforylace, kdy z ADP vzniká ATP a dochází k regeneraci NAD^+ . [78] Z 1 g kyseliny jablečné dojde ke vzniku 0,67 g kyseliny mléčné a 0,33 g oxidu uhličitého. [95]

Při vedení malolaktického kvašení je důležité udržet některé parametry ve vhodných oblastech. Jedná se především o hodnotu pH, teplotu, obsah alkoholu a SO_2 . Odbourávání kyselin bude probíhat snadno, bude-li podle Boua a Steidla [70,77] pH vyšší než 3,2, teplota vyšší než 18°C (okolo $22 - 25^\circ\text{C}$), obsah alkoholu pod 13 obj. % a obsah volného SO_2 pod 10 mg/l.

Důsledkem malolaktického kvašení dochází ke zlepšení kvality vína, organoleptických vlastností a mikrobiologické stability před lahvováním. Za biologické odbourávání kyselin je zodpovědný zejména bakteriální druh *Oenococcus oeni*, který přežívá i v prostředí o vyšší koncentraci etanolu (nad 10 obj. %) a SO_2 (50 mg/l). Dalšími přítomnými kmeny jsou *Lactobacillus* spp. (*Lb. casei*, *Lb. sake*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. fructivoran*), *Leuconostoc* spp. a *Pediococcus* spp. (*Ped. parvulus*, *Ped. damnus*, *Ped. pentosaceus*). [6,124,126,127,128] Může však docházet ke snížení intenzity barvy, jelikož některé bakterie mohou svou metabolickou aktivitou odbourávat fenolické sloučeniny. [129]



Obr. 4 - Přeměna L-jablečné kyseliny na L-mléčnou kyselinu [77,78]

Během alkoholového kvašení jsou kvasinkami spotřebovávány dusíkaté látky (aminokyseliny), poté jsou z nich autolýzou během jejich odumírání další aminokyseliny uvolňovány, stejně tak jako tiamin a další růstové látky, které podporují mléčné bakterie. Je-li mladé víno udržováno v kontaktu s kvasničním kalem, je pak přítomným bakteriím mléčného kvašení k dispozici více peptidů a volných aminokyselin k výživě i k hydrolýze a dekarboxylaci. Tím je vysvětlen vyšší obsah aminů ve vínech, která zůstávají delší dobu v kontaktu s kaly. [3,117,130]

Schopnost bakterií mléčného kvašení dekarboxylovat je také velmi závislá na kmenu bakterií a může být jiná i v rámci jednotlivých druhů. [3] Ovlivněna je také hodnotou pH. Jsou-li hrozny sbírány přezrálé, za účelem zvýšeného obsahu fenolických a aromatických látek, je kyselost nižší. Roste-li pH (přibližně nad hodnotu 3,5), roste i počet a druhy přítomných mikroorganismů. Při vysoké hodnotě pH jsou biogenní aminy vždy produkovány ve velkých množstvích. Červená vína, která jsou méně kyselější než bílá (již proběhlo malolaktické kvašení, kterým došlo k mírnému zvýšení pH), proto obsahují vyšší koncentrace biogenních aminů. [3,51,134]

Vliv na obsah aminů ve víně může mít také typ nádoby, ve které je víno během malolaktického kvašení uchováváno. [118,120] Významně vyšší průměrné koncentrace biogenních aminů byly zjištěny u vín, jejichž malolaktické kvašení probíhalo v nerezových tancích. Bylo totiž zjištěno, že složky dřeva z dubových sudů (přítomné fenolické sloučeniny) mohou obsah aminů nepřímo snižovat. [117] Některými autory bylo popsáno, že fenolické sloučeniny mohou růst a metabolismus mikroorganismů (především mléčných bakterií) podporovat nebo inhibovat, v závislosti na jejich chemické struktuře a koncentraci. [135,136] Jako příklad může být uveden *Lb. hilgardii* v kultivačním médiu, do kterého byla přidána gallová kyselina a katechin v koncentracích, ve kterých se vyskytují ve víně. Koncentrace těchto polyfenolických látek zvýšila bakteriální populaci, jelikož laktobacilus je schopen je metabolizovat ve své růstové fázi, čímž získávaly buňky energii pro růst.

[137] Ve vyšších koncentracích však již mají polyfenoly negativní efekt na bakteriální vývoj. Podle Campose a kol. [138] je *O. oeni*, mikroorganismus s nejvíce histidin dekarboxyláza pozitivními kmeny, citlivější na inaktivaci fenolickými sloučeninami než *Lb. hilgardii*. K dalším fenolickým sloučeninám, které takto mohou ovlivňovat růst bakterií mléčného kvašení, patří hydroxyskořicová či ferulová kyselina. [139]

U malovýrobců vína je ve většině případů aplikováno spontánní malolaktické kvašení. *In vitro* studie provedené dle Moreno-Arribase a Pola [132] zkoumaly schopnost čtyř přidávaných malolaktických starterů tvořit biogenní aminy. Žádným z těchto komerčních starterů nebyla prokázána produkce histaminu, tyraminu ani putrescinu. Jedná se o startery, které neobsahují geny kódující enzymatickou přeměnu na aminy, navíc potlačují přítomnou škodlivou mikroflóru. Tato aplikace se tedy ukázala jako vhodná prevence před tvorbou nadměrného množství aminů ve víně. [3,91,133]

Jakmile je během malolaktického kvašení odbourána veškerá kyselina jablečná, jsou bakterie mléčného kvašení inhibovány sířením. [85]

2.8 Samočištění vína, vylučování vinného kamene, stáčení vína z kalů a školení vína

V období mezi končícím kvašením a stočením vína z kalů dochází k samočištění vína a vylučování vinného kamene. Během samočištění dochází ke srážení bílkovin, barevných látek, tříslovin, slizů a gum a solí kyselin. [11]

Vinný kámen je označení pro hydrogenvinan draselný a vinan vápenatý. Tyto sloučeniny vznikají reakcí ve víně přítomné kyseliny vinné s draslíkem nebo vápníkem. Vinný kámen je málo rozpustný a ve víně způsobuje krystalický zákal ve formě jemného sedimentu. [28,77,140]

Stáčením vína z kalů dochází k odlučování vína od kalů vzniklých sedimentací mrtvých kvasinek, srážením bílkovin a sedimentací vinného kamene. Obvykle bývá prováděno dvakrát. Mezi touto manipulací dochází ke školení vína, jehož cílem je zlepšení a uchování vlastností vína. Principem je opětovná úprava vína, kdy je scelováno (míchání vín stejné odrůdy s různou kvalitou), opět sířeno, poté je čiřeno a filtrováno. [11,77,78] Čiřením (např. bentonitem, taninem nebo polyvinylpyrollidonem) je možné zachytit část přítomných biogenních aminů, a tím snížit jejich koncentraci. Tímto ošetřením může být obsah

histaminu ve víně snížen až o polovinu. [6,76,141] I filtrací může být mírně snížena koncentrace biogenních aminů, jelikož dochází k zachycení některých aminokyselin a peptidů, a tím i ke snížení obsahu aminů v nadcházejícím zrání a stárnutí vína. [6]

2.9 Zrání a skladování vína, lahvování

Během zrání je pozorováno mnoho biochemických změn. Dochází k hydrolýze dusíkatých látek, vzniku aldehydů až melanoidinů, vytváří se buket a dokváší zbytkový cukr. Zrání může probíhat jak v sudech, tak i v lahvách po plnění. [11,77,78]

Před lahvováním by víno mělo být senzorycky zhodnoceno, zda vykazuje vlastnosti běžné pro daný stupeň jakosti a odrůdu. Dále by se mělo vyznačovat ustálenou hladinou SO₂. Je možné také provedení zkoušky tepelné stability bílkovin či stability vína vůči vinnému kameni. Lahve musí být před plněním řádně vyčištěny a dezinfikovány, aby nedošlo k pomnožení mikroflóry, která by mj. mohla zvýšit obsah biogenních aminů ve víně. Ke sterilizaci lahví je možné využít SO₂, H₂O₂, kyselinu peroctovou, ozón či horkou páru. Také samotné plnění by mělo být sterilní. Lahvované víno musí být čisté. Vyzrálé víno může být uzavřeno plastovou či jinou zátkou, nevyzrálé raději přírodním korkem pro umožnění dokončení vývoje vína v lahvi. [77]

Z výzkumů dle Vidal-Caroua a kol. [24] byl nalezen pouze nepatrný nebo žádný vztah mezi teplotou skladování vína a obsahem biogenních aminů ve vínech. Podle jiného zdroje, teplota skladování vína v lahvi mírný vliv na obsah biogenních aminů měla. [142] Během skladování byl také zkoumán vliv typu dubového sudu na obsah aminů, podle Morena a kol. [143] však tento faktor jejich obsah neovlivňuje. Alcaide-Hidalgo a kol. [117] naproti tomu tvrdí, že fenolické sloučeniny obsažené v dubovém dřevě obsah aminů snižují. Tento problém byl již rozebrán v kapitole 2.7 o malolaktickém kvašení.

Podle Romana a Suzziho [95] je průměrné chemické složení vína takové: voda 850 g/l, alkohol 116 g/l (z toho etanol 105 g/l, glycerol 9 g/l, metanol 0,1 g/l), cukry 6 g/l, kyseliny 10 g/l (z toho vinná a jablečná 3 g/l, mléčná 1,5 g/l), minerální látky 2,5 g/l, dusíkaté sloučeniny 3 g/l, fenolické sloučeniny 2 g/l, vitaminy 0,01 g/l.

Z hotového vína je možné izolovat především octové bakterie, a to druhy *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti* či *A. pasteurianus*, *Gluconobacter liquefaciens* a *G. hanseni*. [144] U vín se také můžeme setkat s mnoha chorobami a vadami, které způsobují některé

druhy mikroorganismů. Vznik těchto vad je ovlivněn také vlastnostmi vína, jako je obsah alkoholu, nebo kontaktem vína s kyslíkem. Některé tyto vady jsou popsány v příloze zdroje [145].

3 MIKROORGANIZMY PRODUKUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY

Potenciálně jsou všechny skupiny mikroorganismů schopny vytvářet svými enzymatickými procesy alespoň malá množství některých biogenních aminů. Nejčastěji diskutovanými skupinami mikroorganismů v problematice výroby, případně skladování vína, jsou bakterie mléčného kvašení a kvasinky. [6] Vyskytují se přirozeně na bobulích, ale jsou také přítomny v sudech, tancích a na zařízeních pro výrobu vína. [146]

Bobule mají složitou mikrobiální ekologii, do níž patří bakterie s různými fyziologickými vlastnostmi, kvasinky i vláknité houby. Některé druhy mikroorganismů (parazitické houby) se nacházejí pouze v bobulích, jiné jsou schopny přežít a dále růst i ve vínu (kvasinky a bakterie mléčného a octového kvašení). Podíl jednotlivých mikroorganismů je závislý na fázi zralosti, ve které se bobule při sběru nacházejí, a také na dostupnosti živin. Je-li navíc slupka bobulí poškozena, zvýší se dostupnost cukrů i na povrchu bobule, čímž je podpořen nárůst např. bakterií octového kvašení. [147]

Je třeba zmínit vlivy, které přítomnost dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů ovlivňují. Jedná se především o podmínky okolního prostředí. Tyto vnější faktory mají vliv na samotný růst mikroorganismů. Patří mezi ně již dříve zmíněná přítomnost volných aminokyselin, která ovlivňuje koncentraci vzniklých aminů, dále je to teplota, pH prostředí, přítomnost kyslíku, dostupnost zdrojů sloučenin obsahujících uhlík, koncentrace oxidu siřičitého a etanolu, fáze buněk ad. Vzhledem k různorodosti druhů a kmenů mikroorganismů jsou různé i optimální podmínky pro dekarboxylázovou aktivitu. [68,148,149]

Teplotou je podstatně ovlivněn růst mikroorganismů, a tedy i produkce biogenních aminů. Při optimální teplotě pro růst daného mikroorganismu dochází k aktivaci dekarboxylačních a proteolytických enzymů. Obsah aminů tedy roste v závislosti na činnosti mikroorganismů, a na délce a teplotě skladování. Rozmezí těchto teplot je obvykle 20 - 37°C, jedná-li se však o psychrotrofní kmeny, byla dekarboxylázová aktivita pozorována i při 4°C. Pod teplotu 15°C sice může být zastaven růst mikroorganismů, enzymatická aktivita však nemusí být ovlivněna. [150]

K důležitým faktorům ovlivňujícím výskyt mikroorganismů patří i koncentrace vodíkových iontů. Je-li pH vyšší než 3,5, roste i počet a druhy přítomných mikroorganismů, a tím roste i pravděpodobnost vzniku aminů. [3,51,134] Podle Greifa a kol. [148] se tato hodnota pH pohybuje až okolo 4,0 - 5,5. Tímto je bakteriím vyskytujícím se ve víně umožněna produk-

ce dekarboxyláz, jejichž působením jsou samy chráněny proti překyselení. [148] Některé rody bakterií mléčného a octového kvašení mohou tvorbou kyselin snižovat pH prostředí až pod 4,0. Vzniklé kyseliny mléčná a octová jsou v kyselém prostředí málo disociovány a takto spolu s nízkým pH působí inhibičně až mikrobicidně na ostatní mikroorganismy, s výjimkou jiných bakterií mléčného kvašení a kvasinek. [151] Vína s pH pod 3,5 podle Boua [70] většinou obsahují jen kmeny *Oenococcus oeni*, vína s pH nad tuto hodnotu obsahují různé druhy rodu *Pediococcus* ssp. a laktobacily. Podle Bauera a Dickse [152] však i tyto kmeny přežívají při pH pod 3,5. V prostředí s neutrálním a alkalickým pH můžou být aminy rovněž produkovány, avšak pouze za předpokladu, že bakterie, které je produkují, dokážou prostředí dostatečně okyselit. [15,153]

Přítomnost jednotlivých druhů mikroorganismů ovlivňuje i fakt, zda se nacházejí v aerobním či anaerobním prostředí. Alkoholové kvašení probíhá za nepřítomnosti kyslíku. Stejně tak je důležité mít víno, ve kterém probíhá malolaktické kvašení, i hotové víno naplněné v nádobách až po okraj kvůli eliminaci přítomného kyslíku. Oproti tomu bakterie octového kvašení jsou aerobní mikroorganismy, a proto se dobře rozmnožují tam, kde je meziproduct či hotové víno v kontaktu s kyslíkem. Přístupu kyslíku je tedy nutno zamezit, aby nedocházelo k oxidaci etanolu na kyselinu octovou a k tvorbě nežádoucího aroma a chuti vlivem vzniklého etylacetátu, acetaldehydu, acetoinu a dihydroxyacetonu. [72,77,78,144,154]

Dekarboxylázová aktivita bakterií je také ovlivněna přítomností zkvasitelných sacharidů. Podle Karovičové a Kohajdové [150] se optimální obsah D-glukózy pohybuje od 0,5 do 2,0 hm. %, u hodnot nad 3 hm. % D-glukózy byla pozorována inhibice syntézy některých dekarboxyláz.

Optimální koncentrace SO₂ v moštu nebo ve víně je velmi důležitá kvůli inhibici nežádoucích kmenů bakterií, především pak ke zbrždění rozvoje bakterií octového kvašení. [147] Podle Lonvaud-Funela a Farkaše [85,155] obsah 50 mg/l SO₂ inhibuje přítomné bakterie. Jakmile je mošt vylisován, je také vhodné rychle nastartovat kvašení, čímž dochází ke zvyšování obsahu etanolu a ke tvorbě oxidu uhličitého, a tím i k inhibici octových bakterií. [147]

Mezi bakteriální druhy, které jsou schopny přežít i v prostředí o vysoké koncentraci etanolu, patří zejména *Oenococcus oeni*, který roste i v prostředí obsahujícím více

než 10 obj. % etanolu. Dále jsou přítomny kmeny *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. a *Pediococcus* spp. [6,124,126,127] Na začátku alkoholového kvašení jsou přítomny hlavně laktobacily. Po malolaktickém kvašení jsou přítomny hlavně pediokoky. [70]

3.1 Dekarboxyláza pozitivní bakterie

K mikroorganismům s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou patří řada rodů gramnegativních (*Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Escherichia* spp. aj.) i grampozitivních bakterií (*Bacillus* spp., bakterie mléčného kvašení rodu *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp. či *Streptococcus* spp.). [156,157]

Za výskyt vyšších obsahů histaminu ve víně jsou zodpovědné především bakteriální rody *Pediococcus* spp. (nejvíce druh *Pediococcus parvulus*), *Lactobacillus* spp. (*L. hilgardii* a *L. mali*) a *Leuconostoc* spp. (*L. mesenteroides*). Nejvíce histidin dekarboxyláza-pozitivních kmenů vykazuje *Oenococcus oeni*, který se ve víně vyskytuje nejčastěji a je také nejčastěji spojován s malolaktickým kvašením. Hladiny vzniklého histaminu jsou však obecně nízké. [3,75,158,159,160] Některými kmeny tohoto druhu (ne všemi) může být produkován také putrescin spolu s kadaverinem. [75] Stejně tvrzení platí i v opačném případě, tedy že téměř všechny kmeny oenokoků produkující kadaverin s putrescinem produkují také alespoň malé množství histaminu. [69]

Ke vzniku putrescinu dochází dekarboxylací ornitinu, nicméně z obsahu putrescinu většinou nezjistíme pouze množství volného ornitinu, ale také aminokyseliny argininu, ze kterého ornitin vzniká katabolizmem. Arginin je jedna z hlavních aminokyselin nacházejících se v hroznovém moštu, a je většinou metabolizován kvasinkami při alkoholovém kvašení. Obecně je však stále ve významném množství přítomen i před nástupem malolaktického kvašení. Arginin může být katabolizován několika kmeny bakterií mléčného kvašení, jak laktobacily, tak i výše zmíněnými oenokoky nebo druhem *Leuconostoc mesenteroides*. [3,75,161]

Z bakteriálních rodů, které jsou schopny produkovat mimo jiné aminy i fenyletylamin, můžeme mluvit zejména o rodu *Lactobacillus* spp. (*L. hilgardii*, *L. brevis*, *L. buchneri* a *L. mali*). [27,75,159,162]

Co se týká produkce agmatinu, schopnost dekarboxylovat arginin byla zjištěna u jednoho kmenu *L. hilgardii*. [8,75]

Tyramin bývá ve víně produkován rodem *Lactobacillus* spp., identifikován byl zejména druh *Lactobacillus brevis* nebo některé kmeny *L. hilgardii*. [3,27,62,159] Podle Lonvaud-Funela a Crowa a kol. [3,161] sem patří i *Leuconostoc mesenteroides* a *Enterococcus faecium*.

Mezi jednotlivými kmeny laktobacilů je vysoká variabilita produkce aminů. Tvorba biogenních aminů druhem *Oenococcus oeni* nebo rody *Pediococcus* spp. je podle Lonvaud-Funela a dalších autorů [3,62,72,159] poměrně vzácná (nebo dokonce žádná) a je velmi ovlivňována hodnotou pH, koncentrací etanolu nebo oxidu siřičitého.

Byla také sledována možná produkce biogenních aminů bakteriemi octového kvašení, ale nebyly zjištěny žádné pozitivní výsledky. [159]

3.2 Dekarboxyláza pozitivní kvasinky

Podle Carusa a kol. [63] jsou producenty histaminu ve víně i některé druhy kvasinek, jako např. *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Brettanomyces bruxellensis*. Tyto druhy jsou schopny vyprodukovat až 15 mg/l histaminu. [163] Až u 50 dalších kmenů kvasinek byla zjištěna schopnost produkovat histamin, nicméně většina z nich je schopna jej tvořit pouze ve velmi nízkých nebo nedetekovatelných koncentracích. Jedná se např. o rody *Candida* spp., *Hansenula* spp., *Kloeckera* spp., *Metschnikowia* spp., *Pichia* spp. nebo *Rhodotorula* spp., a také další druhy rodu *Saccharomyces* spp.. [49,63]

Z kvasinek tvořících fenyletylamin a tyramin byl izolován druh *Saccharomyces cerevisiae*. [63,164] Fenyletylamin jsou schopny produkovat kvasinky *Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima* a *Brettanomyces bruxellensis*. [27,75,159,162]

Schopnost dekarboxylovat arginin na agmatin byla zjištěna hlavně u kvasinky *Candida stellata*. [8,75]

3.3 Dekarboxyláza pozitivní plísně

Zvýšený obsah biogenních aminů, zejména fenyletylaminu a izopentylaminu, byl zjištěn u vín, jejichž bobule byly napadeny plísní *Botrytis cinerea*, která je typická u výroby Tokajských vín v Maďarsku. [21,28,165]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce bylo

- popsat význam sledování obsahu biogenních aminů,
- stručně charakterizovat výrobu červených a bílých vín a pokusit se vysledovat fáze, které mohou ovlivnit výskyt biogenních aminů ve finálním výrobku,
- stručně charakterizovat mikroorganismy, které se mohou vyskytovat ve víně (se zaměřením na ty, které mohou produkovat biogenní aminy).

Cílem praktické části diplomové práce bylo

- odebírat vzorky tří odrůd v průběhu výroby vína,
- stanovit u těchto vzorků obsah biogenních aminů,
- výsledky zhodnotit a zformulovat závěr.

5 METODIKA PRÁCE

5.1 Rozdělení vzorků

Pro účely této diplomové práce byly zpracovávány vzorky z obce Novosedly (viniční trať Janův vrch, podoblast Mikulovská, oblast Morava), ročníky 2013 a 2014. Jedná se o odrůdy veltlínské zelené, ryzlink rýnský a rulandské modré, vyráběné jako ekologické produkty, tedy se sníženým obsahem SO₂ ve víně. Každá z těchto odrůd byla odebrána na 4 různých místech viniční trati. Tab. 3 ukazuje jednotlivé fáze odběru, které byly prováděny. U odebraných vzorků byl mikrobiologickým rozbohem stanovován počet mezofilních mikroorganismů, octových bakterií, mléčných bakterií a kvasinek a plísní, a také obsah biogenních aminů.

Tab. 3 - Schéma odběrů vzorků

	VELTLÍNSKÉ ZELENÉ	RYZLINK RÝNSKÝ	RULANDSKÉ MODRÉ
2013	mošt	mošt	rmut
	---	mladé víno	mošt
	21 dní po stáčení	21 dní po stáčení	21 dní po stáčení
	60 dní po stáčení	60 dní po stáčení	60 dní po stáčení
	90 dní po stáčení	90 dní po stáčení	90 dní po stáčení
2014	bobule	bobule	bobule
	mladé víno	---	mladé víno

Pozn.: Podle prováděcího nařízení Komise (EU) č. 203/2012, kterým se mění nařízení (ES) č. 889/2008, kterým se stanoví prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 834/2007, pokud jde o prováděcí pravidla pro ekologickou produkci vína, je do ekologického produktu v odvětví vína povoleno přidat oxid siřičitý nebo disiřičitan draselný či metadisiřičitan draselný v těchto množstvích (tab. 4) [166]:

Tab. 4 - Povolená množství SO₂ v ekologických vínech [166]

DRUH VÍNA	ZBYTKOVÝ CUKR [g/l]	SO ₂ [mg/l]
červená vína	< 2	100
bílá a růžová vína	< 3	150
červená vína	2 - 5	120
bílá a růžová vína	2 - 5	170
pozdní sběr	> 5	270
výběr z hroznů	> 5	320
ledové, slámové, výběr z hroznů, výběr z cibéb	> 5	370

Výsledky rozboru vzorků na obsah biogenních aminů zařazených do sledování v průběhu výroby byly také porovnány s hodnotami naměřenými v komerčních vínech ročníku 2013, taktéž odrůd veltlínské zelené, ryzlink rýnský a rulandské modré (obec Novosedly, podoblast Mikulovská, oblast Morava).

5.2 Mikrobiologický rozbor

Mikrobiologický rozbor byl prováděn dle platných ČSN norem. Obecně používanými normami byly

- ČSN EN ISO 6887-1 Mikrobiologie potravin a krmiv - Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinasobných ředění - Část 1: Všeobecné pokyny pro přípravu výchozí suspenze a desetinasobných ředění,
- ČSN EN ISO 7218 Mikrobiologie potravin a krmiv - Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení,

Za účelem kultivace vybraných skupin mikroorganismů byly použity ČSN normy vztahující se k těmto stanovovaným skupinám mikroorganismů, popsáným na následujících stránkách.

Pro mikrobiologický rozbor byly použity tyto přístroje a pomůcky:

- automatické mikropipety Biohit, Finsko
- předvážky KERN 440-47N (max. 2000 g, d = 0,1 g), Německo
- digitální váha KB800-2- Kern & Sohn GmbH, Německo

- analytické váhy A&D GH-200 EC, Mettler Toledo, ČR
- vortex Heidolph Real top, Německo
- autokláv 135 S, H+P VARIOKLAV, H+P Labortechnik AG, Německo
- filtrační aparatura
- filtrační papír Fisher Scientific s.r.o., 0,45 µm
- biologický termostat BT 120, Laboratorní přístroje Praha
- laboratorní sklo a plasty

Pro přípravu živných půd bylo vypočítáno a naváženo dané množství živné půdy, které bylo rozpuštěno ve 400 ml destilované vody. Směs byla po důkladném promíchání sterilována v autoklávu při teplotě 121°C po dobu 20 minut. Sterilované půdy byly rozlity do prázdných Petriho misek (metoda roztěru a filtrace) nebo po mírném zchlazení rozlity na označené Petriho misky s již napipetovanými vzorky (metoda přelivu). Fyziologický roztok používaný pro desítkové ředění byl vyroben navážením 8,5 g chloridu sodného (LachNer) a rozpuštěním v 1000 ml vody. Takto připravený roztok byl sterilován v autoklávu při teplotě 121°C po dobu 20 minut. Odběry vzorků byly prováděny za aseptických podmínek sterilními pomůckami. Tekuté vzorky byly v poměru 1:9 smíchány s fyziologickým roztokem. V případě pevných vzorků (bobule) byly tyto naváženy v přiměřeném množství a ve stejném poměru s fyziologickým roztokem homogenizovány ve stomacheru po dobu 2 minut.

Celkový počet mezofilních mikroorganismů byl stanovován na agaru Plate Count Agar (dále jen „PCA“) od HiMedia (Indie). Jedná se o neselektivní médium pro stanovení mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů. Půda obsahuje pouze výživné látky trypton, kvasničný extrakt a glukózu. [167,183] Při přípravě agaru byla za účelem inhibice kvasinek a plísní přidána antifungální látka Cycloheximide od Sigma-Aldrich v koncentraci 50 mg/l. Vzorky z ročníku 2013 ve fázi rmutu a moštů byly očkované metodou roztěru v objemu 100 µl, ředění 10⁰ (bez ředění), 10⁻¹ a 10⁻², vždy ve dvou paralelních stanoveních. Z důvodu nulového nárůstu mikroorganismů u některých vzorků byla až po fázi 21 dní po stáčení (včetně) zvolena metoda přelivu, a objemu inokula 1000 µl. Vzorky z odběru 60 dní po stáčení a 90 dní po stáčení nebyly ke kultivaci na této půdě po-

užity vůbec - viz. tab. 5. Kultivace u této půdy probíhala aerobně při teplotě 37°C po dobu 48 hodin.

Tab. 5 - Metody inokulace u jednotlivých odrůd a fází odběrů - 2013

ODRŮDA	FÁZE	AGAR PCA	AGAR AAG	AGAR AAM	AGAR MRS	AGAR TJA	AGAR CHYGA
Veltlínské zelené	mošt	roztěr					
	21 dní po stáčení	přeliv					
	60 dní po stáčení	---	filtrace				---
	90 dní po stáčení	---	filtrace				---
Ryzlink rýnský	mošt	roztěr					
	mladé víno	přeliv					
	21 dní po stáčení	přeliv					
	60 dní po stáčení	---	filtrace				---
	90 dní po stáčení	---	filtrace				---
Rulandské modré	rmut	roztěr					
	mošt	roztěr					
	21 dní po stáčení	přeliv					
	60 dní po stáčení	---	filtrace				---
	90 dní po stáčení	---	filtrace				---

Octové bakterie byly stanovovány na dvou živných půdách: acetobacter agar s glukózou (Acetobacter Agar Glucose) a acetobacter agar s manitolem (Acetobacter Agar Mannitol), dále jen „AAG“ a „AAM“, obojí od HiMedia (Indie). Agar s glukózou obsahuje kvasničný extrakt, uhličitan vápenatý a glukózu, agar s manitolem obsahuje pepton, kvasničný extrakt a manitol. [168,169] Při přípravě agarů byla za účelem inhibice kvasinek a plísní přidána antifungální látka Cycloheximide od Sigma-Aldrich v koncentraci 50 mg/l. Vzorky z ročníku 2013 ve fázi rmutu a moštů byly očkované metodou roztěru v objemu 100 µl, ředění 10^0 a 10^{-1} , vždy ve dvou paralelních stanoveních. Z důvodu nulového nárůstu mik-

roorganismů u některých vzorků byla v následujících fázích odběrů zvolena metoda přelivu, a objemu inokula 1000 μl . Pro zvýšení pravděpodobnosti zachycení mikroorganismů byla u fází 60 a 90 dní od stáčení použita metoda filtrace, kdy bylo filtrováno 10 ml neředěného vzorku - viz. tab. 5. Kultivace probíhala aerobně při teplotě 30°C po dobu 48 hodin.

Kultivace laktobacilů byla provedena na agaru MRS Broth (de Man, Rogosa and Sharpe, dále jen „MRS“) smíchaném s Agar Agar, Type I, obojí od HiMedia (Indie). Výživa je poskytována směsí peptonu, glukózy, hovězího a kvasničného extraktu, hořčík a síran manganatý působí jako růstové stimulanty. Citrát amonný a octan sodný poskytují ochranu proti streptokokům a plísním. Agar je využíván při nízkých hodnotách pH. [170,184] Při přípravě agaru byla za účelem inhibice kvasinek a plísní přidána antifungální látka Cycloheximide od Sigma-Aldrich v koncentraci 50 mg/l. Vzorky z ročníku 2013 ve fázi rmutu a moštů byly očkované metodou roztěru v objemu 100 μl , ředění 10^0 a 10^{-1} , vždy ve dvou paralelních stanoveních. Z důvodu nulového nárůstu mikroorganismů u některých vzorků byla v následujících fázích odběrů zvolena metoda přelivu, a objemu inokula 1000 μl . Pro zvýšení pravděpodobnosti zachycení mikroorganismů byla u fází 60 a 90 dní od stáčení použita metoda filtrace, kdy bylo filtrováno 10 ml neředěného vzorku - viz. tab. 5. Kultivace probíhala anaerobně při teplotě 30°C po dobu 48 hodin.

Mléčné koky byly stanovovány na agaru Tomato Juice Agar (dále jen „TJA“) od HiMedia (Indie). Tento agar je složen z extraktu rajčatové šťávy, peptonů z mléka a enzymatického hydrolyzátu kaseinu (zdroj dusíku, uhlíku, stopových prvků a dalších živin pro růst). [171] Při přípravě agaru byla za účelem inhibice kvasinek a plísní přidána antifungální látka Cycloheximide od Sigma-Aldrich v koncentraci 50 mg/l. Vzorky z ročníku 2013 ve fázi rmutu a moštů byly očkované metodou roztěru v objemu 100 μl , ředění 10^0 a 10^{-1} , vždy ve dvou paralelních stanoveních. Z důvodu nulového nárůstu mikroorganismů u některých vzorků byla v následujících fázích odběrů zvolena metoda přelivu, a objemu inokula 1000 μl . Pro zvýšení pravděpodobnosti zachycení mikroorganismů byla u fází 60 a 90 dní od stáčení použita metoda filtrace, kdy bylo filtrováno 10 ml neředěného vzorku - viz. tab. 5. Kultivace probíhala aerobně při teplotě 30°C po dobu 48 hodin.

Pro stanovení kvasinek a plísní byl použit agar s chloramfenikolem, kvasničným extraktem a glukózou (dále jen „CHYGA“) od HiMedia (Indie). Jedná se o selektivní médium. Chloramfenikol zde slouží jako širokospektrální antibiotikum inhibující doprovodnou bakteriál-

ní mikroflóru, kvasničný extrakt poskytuje růstové faktory vč. vitaminů a minerálních látek, a glukóza je zdrojem energie pro růst. [167,185] Vzorky z ročníku 2013 ve fázi rmutu a moštů byly očkované metodou roztěru v objemu 100 μl , ředění 10^{-1} , 10^{-2} a 10^{-3} , vždy ve dvou paralelních stanoveních. Z důvodu nulového nárůstu mikroorganismů u některých vzorků byla až po fázi 21 dní po stáčení (včetně) zvolena metoda přelivu, a objemu inokula 1000 μl . Vzorky z odběru 60 dní po stáčení a 90 dní po stáčení nebyly ke kultivaci na této půdě použity vůbec - viz. tab. 5. Kultivace probíhala aerobně při teplotě 23°C po dobu 5 dnů.

Všechny vzorky z ročníku 2014 (fáze bobulí a mladého vína) byly očkované metodou přelivu, objem inokula 1000 μl , taktéž ve dvou paralelních stanoveních. Pro mikrobiologický rozbor byly použity stejné půdy jako pro vzorky z ročníku 2013.

Pro stanovení počtu kolonie tvořících jednotek byly na všech agarových plotnách spočítány viditelné makroskopické kolonie, které zde vyrostly. Pro vyjádření počtu mikroorganismů byly používány dva výpočty, a to buď výpočet pro Petriho misky stejného ředění (rov. 4) nebo pro dvě Petriho misky po sobě jdoucího ředění (rov. 5).

$$N = \Sigma c / n.d.V \quad (4)$$

kde N je počet mikroorganismů [KTJ/ml nebo KTJ/g], Σc je počet všech kolonie tvořících jednotek (příslušné skupiny mikroorganismů) na plotnách použitých pro výpočet, n je počet ploten použitých pro výpočet, d příslušné použité ředění a V objem očkovaného inokula [ml]. [167]

$$N = \frac{\Sigma c}{V.(n_1 + 0,1.n_2).d} \quad (5)$$

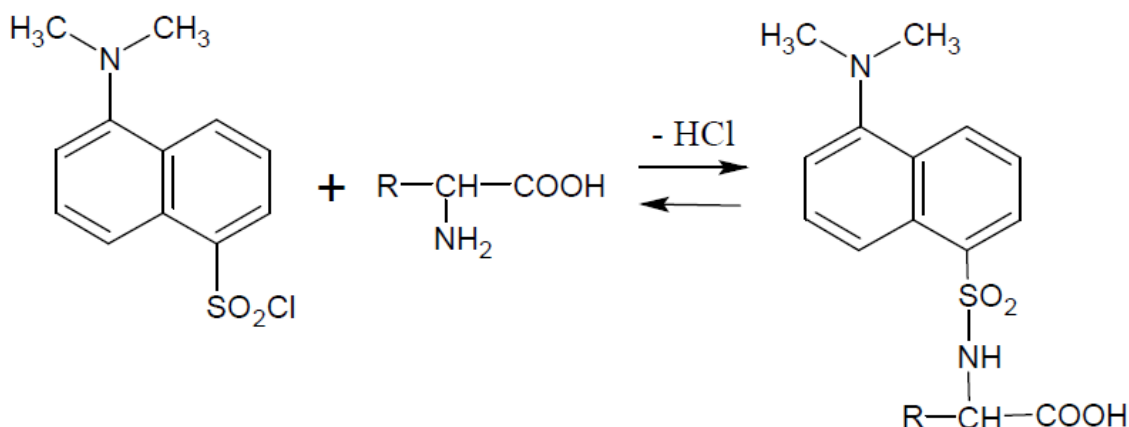
kde N je počet mikroorganismů [KTJ/ml nebo KTJ/g], Σc je počet všech kolonie tvořících jednotek (příslušné skupiny mikroorganismů) na všech plotnách použitých pro výpočet, n_1 je počet ploten prvního ředění použitého pro výpočet a n_2 počet ploten druhého ředění použitého pro výpočet, d je ředící faktor odpovídající prvnímu pro výpočet použitému ředění a V objem inokula očkovaného na každou plotnu [ml]. [167]

Podle normy ČSN 56 9609 Pravidla správné hygienické a výrobní praxe - Mikrobiologická kritéria pro potraviny a Principy stanovení a aplikace, a také dle Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny, se víno řadí do skupiny potravin mikrobiologicky nerizikových. U těchto potravin se mik-

robiologické požadavky nestanovují, jelikož díky jejich složení, technologii použité k výrobě a jejich vlastnostem z hlediska ekologie mikroorganismů (aktivita vody, hodnota pH, obsah antimikrobiálních látek apod.) jsou pokládány za mikrobiologicky nerizikové. [131,175] Mikrobiologický rozbor v této diplomové práci byl tedy uskutečňován spíše z důvodu spojitosti přítomnosti dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů a výskytu biogenních aminů. Je však třeba dodat, že dekarboxyláza pozitivními mikroorganismy mohou být i jiné skupiny mikroorganismů, než které byly v této práci stanovovány.

5.3 Stanovení obsahu biogenních aminů

Pro detekci biogenních aminů byly vzorky upraveny pomocí dansylace. Dansylchlorid (5-N,N'-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchlorid), sloužící jako derivatizační činidlo, poskytuje s aminy deriváty (obr. 5) a umožňuje tak jejich detekci. Optimální pH prostředí pro tuto reakci je 9,5 - 10,0. [172,173]



Obr. 5 - Schéma derivatizace aminů na příslušné dansylchloridy [173]

Při reakci dansylchloridu s aminokyselinou reaguje nejprve aminoskupina. Je-li dansylchlorid v nadbytku, reakcí vznikají směsné anhydridy, zejména při vyšším pH. Tyto anhydridy se poté rozpadnou a vzniká oxid uhelnatý, dansylamin, aldehyd kratší o jeden uhlík než původní aminokyselina, a dimethylaminonaftalen-1-sulfová kyselina. [173]

Derivatizace probíhá výhradně před kolonou. Vzniklé dansylderiváty jsou žluté krystalické látky rozpustné v organických rozpouštědlech a jen mírně rozpustné ve vodě. Při teplotě 4°C jsou stabilní 2 týdny. [173]

Dansylace byla prováděna dle Dadákové a kol. [174] Každý vzorek byl analyzován ve čtyřech paralelních stanoveních. Tab. 6 popisuje postup derivatizace pro pevné vzorky (bobule) i tekuté vzorky.

Tab. 6 - Postup derivatizace [174]

VZOREK BOBULÍ	TEKUTÝ VZOREK
po rozmělnění navážit 1g do 15 zkumavky	promíchat vzorek
přidat 10 ml 0,6M HClO ₄ a promíchat na vortexu	odebrat 3 ml vzorku
třepat na třepačce 30 min, odstředit 2 min při 6000 ot.	zředit v poměru 1:1 s 1,2M HClO ₄
přelít do 25 ml odměrné baňky	promíchat na vortexu
přidat 7 ml 0,6M HClO ₄ a promíchat na vortexu	přelít 1 ml zředěného vzorku do derivatizační nádoby (4 paralelní stanovení)
třepat na třepačce 20 min, odstředit 2 min při 6000 ot.	
přelít do 25 ml odměrné baňky	
přidat 7 ml 0,6M HClO ₄ a promíchat na vortexu	
třepat na třepačce 20 min, odstředit 2 min při 6000 ot.	
přelít do 25 ml odměrné baňky	
filtrat přes papírový filtr	
přidat 100 µl vnitřního standardu (1,7-heptandiamin o konc. 500 mg/l)	
odpipetovat 1 ml vzorku do derivatizační nádoby (4 paralelní stanovení)	
přidat 1,5 ml uhličitanového pufru o pH 11,0 - 11,1	
přidat 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu o konc. 5 g/l v acetonu	
uzavřít a třepat 20 hod v temnu	
přidat 200 µl roztoku prolinu	
uzavřít a třepat 1 hod	
přidat 3 ml heptanu a 3 min ručně třepat	
odpipetovat 1 ml heptanové vrstvy do vialky	
odpařit do sucha pod proudem dusíku při 60°C	
zředit suchý odparek 1,5 ml acetonitrilu	

Do doby analýzy byly vzorky uchovávány v mrazícím zařízení. Bezprostředně před analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 µm.

Příprava pufru (AB):

A 0,5 mol/l NaHCO₃ (21 g/500 ml)

B 0,5 mol/l Na₂CO₃ (13,25 g/250 ml)

- 50 ml A (NaHCO₃) smícháno s B (Na₂CO₃); roztokem B upraveno na pH 9,2
- přidán čerstvě připravený K₂CO₃ o koncentraci 0,333 g/ml

Pro stanovení biogenních aminů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) byly použity tyto chemikálie:

- standardy: histamin 97 %, 2-fenyletylamin, tyramin 99 %, putrescin dihydrochlorid, kadaverin, spermidin, spermin, tryptamin, 1,7-diaminoheptan - SIGMA - ALDRICH
- kyselina chloristá 70 - 70 % pro analýzu ACA, ISO, Reag. Ph Eur - MERCK
- hydrogenuhličitan sodný pro analýzu ACS, Reag. pH Eur - MERCK
- uhličitan sodný bezvodý pro analýzu ACS, Reag. Ph Eur - MERCK
- uhličitan draselný pro analýzu ACS, ISO, Reag. Ph Eur - MERCK
- Dansyl chloride BioReagent, suitable for amino acid labeling, powder and chunks, ≥ 99 % (HPLC) - SIGMA - ALDRICH
- L-Proline for biochemistry - MERCK
- Heptane CHROMASOLV®, for HPLC, ≥ 99 % - SIGMA – ALDRICH
- Acetonitrile CHROMASOLV® Plus, for HPLC, ≥ 99.9 % - SIGMA – ALDRICH

Pro chromatografické stanovení biogenních aminů byly použity tyto přístroje:

- analytické váhy A&D GH-200 EC prodejce LABICOM s.r.o., ČR, Olomouc
- laboratorní třepačka LT2
- odstředivka EBA 21, Hettich ZENTRIFUGEN, Germany, Tuttlingen
- EUTECH INSTRUMENTS pH510 zakoupený u firmy BioTech a.s., Praha, stolní pHmetr
- termoblok EVATERM

- systém HPLC (binární pumpa LabAlliance, USA, autosampler LabAlliance, USA, kolona s termostatem; UV/VIS DAD detektor ($\lambda = 254$ nm); a degaser 1260 Infinity, Agilent Technologies) - kolona Agilent Eclipse Plus C18 RRHD o rozměrech 50 mm, 3 mm, 1,8 μm ; průtok 0,45 ml/min a teplota 30°C

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Výsledky mikrobiologického rozboru

Následující výsledky mikrobiologického rozboru udávají interval, ve kterém se dané mikroorganismy vyskytovaly na příslušných půdách po kultivaci.

6.1.1 Výsledky stanovení u veltlínského zeleného

Tab. 7 zobrazuje výsledky mikrobiologického rozboru veltlínského zeleného ročníku 2013.

Tab. 7 - Výsledky mikrobiologického rozboru - veltlínské zelené 2013 [KTJ/g]

	MOŠT	21 DNÍ PO STÁČENÍ	60 DNÍ PO STÁČENÍ	90 DNÍ PO STÁČENÍ
CELKOVÝ POČET MEZOFILNÍCH	< 10	ND	---	---
OCTOVÉ BAKTERIE (agar s glukózou)	< 10	< 10	< 10	< 10
OCTOVÉ BAKTERIE (agar s manitolem)	1 . 10 - 2 . 10	< 10	< 10	< 10
LAKTOBACILY	ND	ND	ND	ND
MLÉČNÉ KOKY	< 10	ND	ND	ND
KVASINKY A PLÍSNĚ	1,5 . 10 ² - 2,2 . 10 ³	< 10	---	---

Pozn.: Zkratka „ND“ značí, že na půdě nebyl zaznamenán žádný nárůst příslušného mikroorganismu.

V moštu této odrůdy byl zaznamenán pouze nízký počet mikroorganismů. Na některých selektivních půdách byl zaznamenán stejný nebo vyšší počet mikroorganismů než na půdě PCA pro celkový počet mezofilních. Důvodem může být fakt, že selektivní půdy poskytují daným skupinám mikroorganismů lepší výživu než „univerzální“ půda PCA. Tento výsledek byl zjištěn u všech odrůd i obou ročníků, se kterými bylo pracováno. Ve fázi vína po 21 dnech od stočení z kalů už nebyly zjištěny žádné mezofilní mikroorganismy. Bude-li brát v úvahu již zmíněnou vyšší selektivitu ostatních půd (včetně jejich schopnosti

podpořit růst dané skupiny mikroorganismů), odpovídá snížení počtu kolonií na této půdě i snížení počtu octových a mléčných bakterií ve stejné fázi.

Podle Baraty a kol. a Barbeho a kol. [176,177] se bakterie octového kvašení vyskytují v poškozených bobulích, a jejich počet se pohybuje mezi 10^2 až 10^6 KTJ/g. Naproti tomu du Toit [71] popisuje, že 10^2 KTJ/g octových bakterií hovoří o stále zdravých (nepoškozených) bobulích. Budeme-li předpokládat alespoň mírnou kontaminaci během drcení hroznů v mlýnku, můžeme z výsledku mikrobiologického rozboru také předpokládat, že bobule byly sbírány nepoškozené. V průběhu výroby vína klesnul počet octových bakterií pouze na agaru s manitolem, a to pouze mezi fází moštu a mladého vína po 21 dnech od stočení z kalů. Na kultivační půdě s glukózou byl jejich počet ve všech fázích výroby stejný. Moreno-Arribas a Polo [6] popisují vliv síření na výskyt (nejen) dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů. S množstvím přidaného disiřičitanu klesá pH, a tím jsou zhoršeny podmínky pro přežití mikroorganismů. Pokud však nemá víno (nebo jeho meziprodukty) dostatečně nízké pH, je zvýšena pravděpodobnost přežití některých mikroorganismů. Vliv na počet mikroorganismů mají i hygienické podmínky ve vinném sklepě. [6,11] Vysoký počet octových bakterií pak může ve víně způsobit nežádoucí octovatění. V případě veltlínského zeleného 2013 však byly počty těchto bakterií minimální.

Ve fázi moštu je populace mléčných bakterií řádově okolo 10^2 až 10^4 KTJ/g. [85] Tomuto tvrzení se blíží i výsledek našeho mikrobiologického rozboru, nárůst byl však zaznamenán pouze na půdě TJA, a to v menším počtu kolonií než tvrdí literatura. Nepřítomnost těchto bakterií na půdě MRS je zdůvodněna ve článku Lonvaud-Funela [85], ve kterém se tvrdí, že je jen málo kmenů bakterií mléčného kvašení schopno růst na médiu MRS v laboratorních podmínkách. Toto bylo potvrzeno v každé fázi odběru, a také u téměř všech vzorků vín.

Během prvních dnů alkoholového kvašení roste počet bakterií mléčného kvašení na maximální hodnotu okolo 10^4 KTJ/g, poté se opět snižuje k 10^2 KTJ/g. Jejich počet je totiž ovlivněn obsahem etanolu, jehož maximální koncentrace může být pro mléčné bakterie maximálně 6 obj. %. [85] Od fáze vína po 21 dnech od stočení z kalů již nebyl zaznamenán žádný nárůst bakterií mléčného kvašení. Není však vyloučeno, že se zde vyskytovaly i jiné mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou.

Počet kvasinek v moštu se podle Fleeta a van Schothorsta [89,90] pohybuje mezi 10^3 a 10^5 KTJ/g. Vliv na jejich počet má i čistota mlýnku a nádob. [6,11] V moštu veltlínského zeleného 2013 bylo toto množství řádově 10^2 až 10^3 KTJ/g. Ve fázi 21 dnů od stočení z kalů byl počet kvasinek minimální. Ikdyž nebyla kultivace těchto mikroorganismů v pozdějších fázích výroby vína provedena, můžeme předpokládat, že se zde již nevyskytovaly. V průběhu dokvácení a samočištění vína jsou již kvasinky mrtvé a sedimentují v nádobě, odkud jsou pak odstraněny filtrací. [11,104]

Tab. 8 popisuje výsledky mikrobiologického rozboru veltlínského zelené ročníku 2014.

Tab. 8 - Výsledky mikrobiologického rozboru - veltlínské zelené 2014 [KTJ/g]

	BOBULE	MLADÉ VÍNO
CELKOVÝ POČET MEZOFILNÍCH	$3,0 \cdot 10^2 - 2,8 \cdot 10^2$	ND
OCTOVÉ BAKTERIE (agar s glukózou)	$4,2 \cdot 10^2 - 2,3 \cdot 10^3$	ND
OCTOVÉ BAKTERIE (agar s manitolem)	$5,1 \cdot 10^2 - 2,0 \cdot 10^4$	ND
LAKTOBACILY	ND	ND
MLÉČNÉ KOKY	$9,5 \cdot 10^2 - 2,3 \cdot 10^3$	ND
KVASINKY A PLÍSNĚ	$3,2 \cdot 10^3 - 1,0 \cdot 10^4$	ND

Celkový počet mezofilních mikroorganismů byl na půdě PCA opět nižší než počty jednotlivých skupin mikroorganismů na selektivních půdách.

Počet kolonie tvořících jednotek na gram octových bakterií v bobulích se na půdách pohyboval okolo 10^2 až 10^4 KTJ/g, což odpovídá i tvrzení du Toita a kol. [71], stejně tak jako odpovídá počet přítomných kvasinek tvrzení Fleeta a kol. [178]. Vliv na počet kvasinek má i to, zda jsou sbírány všechny hrozny dohromady, tedy zdravé i poškozené, nebo odděleně. [179]

Populace mléčných bakterií v bobulích je dle Boua, Baraty a kol. a Hearda s Fleetem [70,176,180] vždy nižší než počet kvasinek. Toto bylo potvrzeno i našim mikrobiologickým rozbohem. Bakterie mléčného kvašení se podle těchto autorů vyskytují v hroznech v počtech nižších než 10^2 KTJ/g. Byly pozorovány opět pouze na půdě TJA, jejich počet byl v širším intervalu než tyto zdroje udávají.

Ve fázi mladého vína nebyl na žádné použité půdě zjištěn nárůst kolonií. Není však vyloučeno, že se ve víně mohly vyskytovat jiné skupiny mikroorganismů schopné dekarboxylovat přítomné volné aminokyseliny.

6.1.2 Výsledky stanovení u ryzlinku rýnského

Následující tabulka (tab. 9) zobrazuje výsledky mikrobiologického rozboru ryzlinku rýnského ročníku 2013.

Tab. 9 - Výsledky mikrobiologického rozboru - ryzlink rýnský 2013 [KTJ/g]

	MOŠT	MLADÉ VÍNO	21 DNÍ PO STÁČENÍ	60 DNÍ PO STÁČENÍ	90 DNÍ PO STÁČENÍ
CELKOVÝ POČET MEZOFILNÍCH	< 10	< 2,0 . 10	ND	---	---
OCTOVÉ BAKTERIE (agar s glukózou)	6,2 . 10 ³ - 1,4 . 10 ⁵	N	< 10	< 10	< 10
OCTOVÉ BAKTERIE (agar s manitolem)	6,5 . 10 ³ - 1,2 . 10 ⁵	N	ND	ND	ND
LAKTOBACILY	7,9 . 10 ⁴ - 1,0 . 10 ⁵	ND	ND	ND	ND
MLÉČNÉ KOKY	2,0 . 10 ⁴ - 1,1 . 10 ⁵	N	ND	ND	ND
KVASINKY A PLÍSNĚ	4 . 10 ³ - 8,0 . 10 ⁴	7,6 . 10 ⁴ - 1,0 . 10 ⁵	< 10	---	---

Pozn.: Zkratka „N“ označuje nepočítatelně mnoho kolonií.

Na půdě PCA byly v moštu ryzlinku rýnského zaznamenány pouze jednotky kolonií na gram mezofilních mikroorganismů.

Počet bakterií octového kvašení v moštu se pohyboval v rozmezí 10³ až 10⁵ KTJ/g. Pokud bychom předpokládali, že hrozny byly sbírány šetrně bez mechanického poškození, a pouze během přepravy a drcení došlo ke kontaktu s nádobami a mlýnkem, které mohly být nositeli další mikroflóry, souhlasí tento počet se zdrojem [71]. Tomuto tvrzení odpovídá i počet kvasinek, který podle Fleeta a kol. [178] ukazuje, že bobule této odrůdy byly sbírány nepo-

škozené, a ani během mletí a lisování hroznů nedošlo k výrazné kontaminaci z výrobních zařízení.

Počet bakterií mléčného kvašení v moštu až dvojnásobně přesahoval jejich běžný počet v bobulích. Příčinou mohla být kontaminace z výrobních zařízení nebo nádob, ve kterých byl rmut nebo mošt uchováván. [6,11]

Po alkoholovém kvašení mírně vzrostl počet mezofilních mikroorganismů a kvasinek. Nárůst na půdě PCA odpovídá také zvýšení počtu octových bakterií a mléčných koků. Ve fázi mladého vína bylo na obou agarrech pro octové bakterie i na agaru pro mléčné koky nalezeno nepočítatelně mnoho kolonií. Tento nárůst byl zaznamenán u neřaděného vzorku i u ředění 10^{-1} . Je možné, že i tyto počty mohou být příčinou kontaminace. Zvýšený počet kvasinek mohl být způsoben kontaminací mladého vína během přemísťování mezi nádobami, nebo mohla být kontaminována nádobka, ve které byly vzorky převáženy k analýzám. [6,11]

Ve fázi 21 dní po stáčení vína z kalů došlo ve všech případech ke snížení počtu mikroorganismů na minimální nebo nulové hodnoty. Vlivem dokvásašení zbytku cukrů a zvýšením koncentrace etanolu ve víně došlo k usmrcení zbývajících mikroorganismů, které se zde vyskytovaly. [104] Pouze na AAG byl zjištěn nízký počet octových bakterií, jejichž přežití mohlo být způsobeno nedostatečným naplněním vína do nádob, čímž byla podpořena oxidace a přežití těchto mikroorganismů. [72,77,78,144,154] V dalších fázích samočištění a zrání vína se počet octových bakterií na této kultivační půdě nezměnil. Na druhé půdě pro octové bakterie i na obou půdách pro mléčné bakterie již nebyly zaznamenány žádné kolonie.

Tab. 10 zobrazuje výsledky mikrobiologického rozboru ryzlinku rýnského ročníku 2014.

Tab. 10 - Výsledky mikrobiologického rozboru - ryzlink rýnský 2014 [KTJ/g]

CELKOVÝ POČET MEZOFILNÍCH	$1,5 \cdot 10^2 - 3,0 \cdot 10^3$
OCTOVÉ BAKTERIE (agar s glukózou)	$3,6 \cdot 10^2 - 3,1 \cdot 10^4$
OCTOVÉ BAKTERIE (agar s manitolem)	$9,8 \cdot 10^2 - 6,3 \cdot 10^3$
LAKTOBACILY	< 10
MLÉČNÉ KOKY	$1,2 \cdot 10^2 - 2,5 \cdot 10^3$
KVASINKY A PLÍSNE	$2,7 \cdot 10^3 - 1,3 \cdot 10^5$

Pozn.: Vzhledem k nepříznivému počasí v průběhu roku 2014 nebyla výroba vína z ryzlinku rýnského vůbec uskutečněna. Mikrobiologický rozbor byl tedy proveden pouze z bobulí této odrůdy.

Celkový počet mezofilních mikroorganismů přibližně odpovídal nebo byl nižší než počty kolonií na selektivních půdách. Počet bakterií octového kvašení na obou půdách odpovídal tvrzení du Toita a kol. [71], že bobule byly posbírány šetrným způsobem a nebyly mechanicky poškozeny. Množství bakterií mléčného kvašení bylo nižší než počet kvasinek, což odpovídá i výsledku mikrobiologického rozboru dle Boua, Baraty a kol. a Francescy a kol. [70,176,180]. Nárůst na půdě MRS byl minimální, protože podle Lonvaud-Funela [85] jen málo kmenů mléčných bakterií roste na této půdě v laboratorních podmínkách. Počet kvasinek odpovídal hodnotám popsaným ve článku Ribéreau-Gayona a kol. [73].

6.1.3 Výsledky stanovení u rulandského modrého

Následující tabulka (tab. 11) popisuje výsledky mikrobiologického rozboru rulandského modrého ročníku 2013.

Tab. 11 - Výsledky mikrobiologického rozboru - rulandské modré 2013 [KTJ/g]

	RMUT	MOŠT	21 DNÍ PO STÁČENÍ	60 DNÍ PO STÁČENÍ	90 DNÍ PO STÁČENÍ
CELKOVÝ POČET MEZOFILNÍCH	6,0 . 10 ⁻ 1,6 . 10 ²	7,2 . 10 ⁻ 1,5 . 10 ²	< 10	---	---
OCTOVÉ BAKTERIE (agar s glukózou)	5,0 . 10 ² - 1,9 . 10 ³	6,3 . 10 ² - 2,5 . 10 ⁴	< 10	ND	N
OCTOVÉ BAKTERIE (agar s manitolem)	1,7 . 10 ² - 3,5 . 10 ²	1,9 . 10 ² - 3,5 . 10 ²	< 10	< 10	N
LAKTOBACILY	ND	ND	ND	ND	ND
MLÉČNÉ KOKY	7,3 . 10 ² - 1,4 . 10 ³	3,4 . 10 ² - 3,0 . 10 ³	ND	ND	ND
KVASINKY A PLÍSNĚ	5,5 . 10 ³ - 1,5 . 10 ⁴	7,2 . 10 ³ - 1,1 . 10 ⁴	< 10	---	---

Celkový počet mezofilních mikroorganismů v rulandském modrém 2013 se pohyboval ve stejných hodnotách u rmutu i u moštu. Opět je zde viditelný menší počet kolonií než u selektivních půd. Ve fázi vína po 21 dnech od stočení z kalů byl celkový počet mezofilních minimální, a odpovídal také počtům kolonií na ostatních agarech.

Počty bakterií octového kvašení ve rmutu dosahovaly hodnot od 10² do 10³ KTJ/g. V moštu se pak tyto počty mírně zvýšily, nejspíš z důvodu styku s lisem a nádobami, ve kterých mohly být přítomny další mikroorganismy. [6,11] Po vykvašení byl počet octových bakterií na obou agarech nižší než 10 KTJ/g, nicméně ve fázi, kdy bylo víno 90 dní po stočení z kalů, jejich počet narostl do hodnot, které nebyly na půdách bez ředění spočitatelné. Toto víno mohlo být uchováváno za přítomnosti kyslíku, který podpořil další rozvoj octových bakterií. [72,77,78,144,154]

Tab. 12 zobrazuje výsledky mikrobiologického rozboru rulandského modrého ročníku 2014.

Tab. 12 - Výsledky mikrobiologického rozboru - rulandské modré 2014 [KTJ/g]

	BOBULE	MLADÉ VÍNO
CELKOVÝ POČET MEZOFILNÍCH	$3,9 \cdot 10 - 2,7 \cdot 10^2$	ND
OCTOVÉ BAKTERIE	$9,3 \cdot 10 - 2,6 \cdot 10^3$	ND
OCTOVÉ BAKTERIE	$1,4 \cdot 10^2 - 2,8 \cdot 10^3$	ND
LAKTOBACILY	< 10	ND
MLÉČNÉ KOKY	$2,1 \cdot 10 - 2,5 \cdot 10^3$	ND
KVASINKY A PLÍSNĚ	$2,3 \cdot 10^2 - 3,1 \cdot 10^4$	ND

Počet octových bakterií v bobulích odpovídal na obou kultivačních půdách tvrzení du Toita [71], který tvrdí, že byly hrozny posbírány šetrně, s minimálním mechanickým poškozením. Výskyt bakterií mléčného kvašení byl opět nižší než počet kvasinek [70,176,180], počty kvasinek odpovídaly hodnotám uvedeným Fleetem a kol. [178]. Celkový počet mezofilních mikroorganismů byl opět nižší než u většiny ostatních půd.

V mladém vínu nebyl zaznamenán růst kolonií na žádné vybrané kultivační půdě.

6.1.4 Výsledky mikrobiologického rozboru komerčních vín

V tab. 13 jsou zobrazeny výsledky mikrobiologického rozboru komerčních vín z roku 2013, která byla ve fázi zrání.

Tab. 13 - Výsledky mikrobiologického rozboru komerčních vín [KTJ/g]

	VELTLÍNSKÉ ZELÉNÉ	RYZLINK RÝNSKÝ	RULANDSKÉ MODRÉ
CELKOVÝ POČET MEZOFILNÍCH	ND	ND	< 10
OCTOVÉ BAKTERIE (agar s glukózou)	ND	ND	$\approx 3,4 \cdot 10$
OCTOVÉ BAKTERIE (agar s manitolem)	< 10	< 10	$\approx 3,2 \cdot 10$
LAKTOBACILY	ND	ND	ND
MLÉČNÉ KOKY	ND	ND	ND
KVASINKY A PLÍSNĚ	ND	ND	< 10

U veltlínského zeleného a ryzlinku rýnského byl zjištěn růst kolonií pouze na agaru s manitolem pro octové bakterie. Tyto hodnoty byly minimální, pro zachování mikrobiologické i sensorické kvality by však mělo být doporučeno uchovávat víno v plných lahvích s minimálním přístupem kyslíku, při přemísťování do jiných nádob také zajistit čistotu zařízení. Tímto opatřením by mělo být zabráněno octovatění vína. [72,77,78,144,154]

U rulandského modrého byl zjištěn vyšší počet octových bakterií. Příčinou může být výše zmíněný kontakt vína s kyslíkem nebo nečistými zařízeními a nádobami, nebo také delší kontakt moštu se slupkami během macerace červeného vína. [6,77,78,88] Tomuto tvrzení by odpovídal i vyšší počet kvasinek, který byl však v této fázi minimální.

6.1.5 Porovnání výsledků mikrobiologického rozboru mezi víny zařazenými do sledování v průběhu výroby a komerčními víny

K porovnání výsledků ve fázi zrání u komerčních vín byly z vín zařazených do sledování v průběhu výroby vzaty fáze 21, 60 a 90 dní po stáčení z kalů.

Porovnáme-li výsledky mikrobiologického rozboru u odrůdy veltlínské zelené ročníku 2013, můžeme říci, že počty kolonie tvořících jednotek na gram byly ve stejných intervalech. V případě stanovení celkového počtu mezofilních mikroorganismů i obou pūd pro mléčné bakterie nebyly v obou případech na pūdách po kultivaci detekovány žádné kolonie. Na agaru s manitolem pro octové bakterie byl v obou případech zjištěn výskyt maximálně 10 KTJ/g. Ve vínech zařazených do sledování bylo pozorováno maximálně 10 KTJ/g počet octových bakterií na pūdě s glukózou i kvasinek a plísni, v komerčních vínech nebyly na těchto pūdách detekovány žádné mikroorganismy. Výsledky tedy také můžeme považovat za srovnatelné.

V případě ryzlinku rýnského 2013 jsou výsledky porovnání obdobné. Počty kolonií na gram se shodují u stanovení celkového počtu mezofilních mikroorganismů i u obou pūd pro mléčné bakterie. Na agaru s glukózou pro octové bakterie a pro kvasinky a plísně byly zaznamenány minimální počty kolonií (do 10 KTJ/g), v komerčních vínech nebyly detekovány žádné kolonie. Opačný případ nastal u pūdy pro octové bakterie s manitolem, na které v případě vín zařazených do sledování nebyl zjištěn žádný nárůst, a u komerčních vín bylo detekováno do 10 KTJ/g. Opět můžeme považovat výsledky za srovnatelné.

V odrůdě rulandské modré ročníku 2013 se při porovnání mezi víny zařazenými do sledování a komerčními víny shodovaly výsledky rozboru na půdách pro stanovení celkového počtu mezofilních mikroorganismů, pro mléčné bakterie i pro kvasinky a plísň. Počty kolonií se zde pohybovaly maximálně do 10 KTJ/g, případně nebyl zjištěn žádný nárůst. V případě octových bakterií v komerčních vínech byl jejich počet na obou půdách mírně vyšší než ve fázích 21 nebo 60 dní po stáčení. V porovnání s fází 90ti dní od stáčení byl však tento počet zanedbatelný, jelikož ve vínech zařazených do sledování bylo 90 dní po stáčení nalezeno nepočítatelně mnoho kolonií.

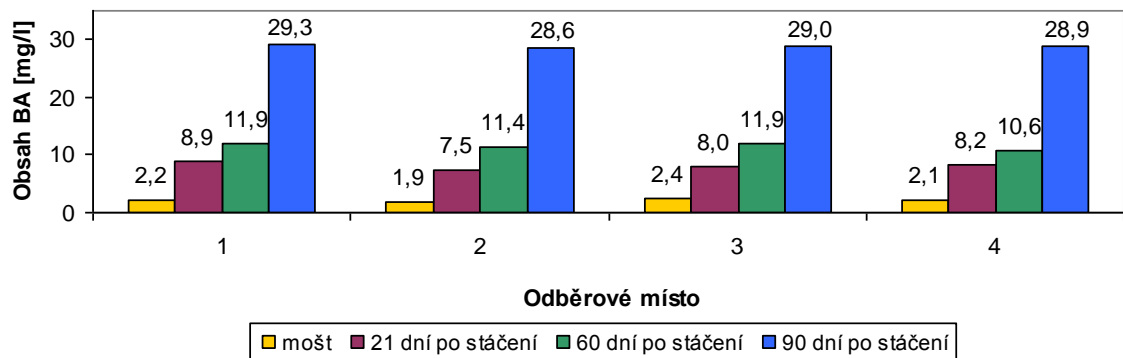
Po porovnání vín zařazených do sledování v průběhu výroby a vín komerčních můžeme výsledky mikrobiologického rozboru považovat za srovnatelné, ikdyž u vzorků komerčních vín se nejednalo o produkty ekologického zemědělství.

6.2 Výsledky stanovení obsahu biogenních aminů

Chromatografický systém s UV/VIS DAD detekcí je schopen detekovat jednotlivé deriváty biogenních aminů, a to tryptaminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu.

6.2.1 Výsledky stanovení u veltlínského zeleného

Následující graf zobrazuje koncentraci biogenních aminů v jednotlivých odběrových místech veltlínského zeleného 2013 (obr. 6). Hodnota v každém sloupci je suma všech detekovaných biogenních aminů v konkrétní fázi a odběrovém místě.

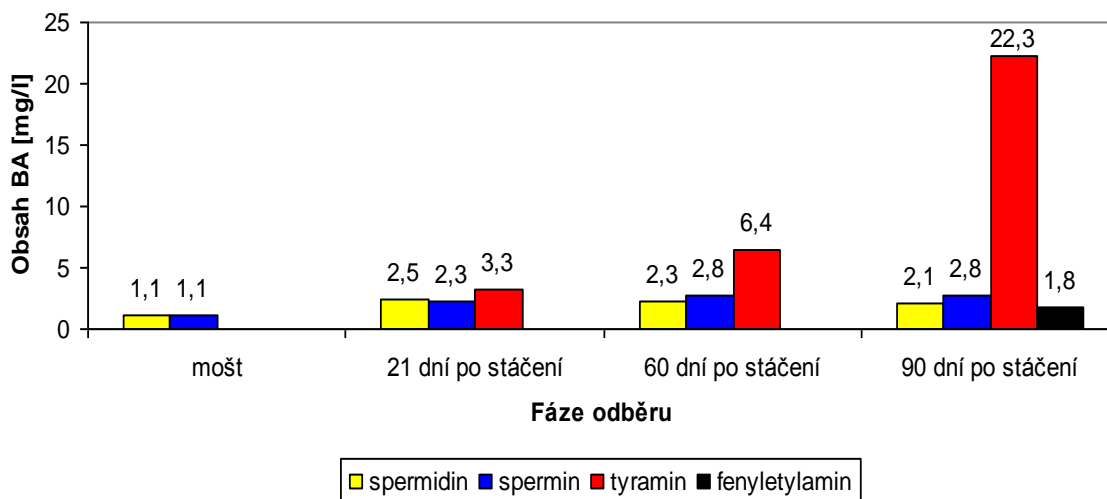


Obr. 6 - Obsah biogenních aminů z různých odběrových míst
- veltlínské zelené 2013

V moštu byla koncentrace aminů vždy nejnižší (jen okolo 2 mg/l). Tyto biogenní aminy mohly vzniknout díky dekarboxyláza pozitivním mikroorganismům přítomným už na bobulích. [3,28,59,74,75,76] Hodnoty jsou zde nejnižší proto, že ne všechny volné aminokyseliny v moštu byly využity přítomnou dekarboxyláza pozitivní mikroflórou, ale byly hlavně živinami pro nastávající alkoholové kvašení. [3,117,130]

V důsledku prodlužující se doby skladování vína byl u všech odběrových míst během dalších fází výroby zjištěn nárůst počtu biogenních aminů. [6,150] Dalším možným důvodem je možnost kontaminace vzorku dalšími dekarboxyláza pozitivními mikroorganismy během přepravy k analýzám. [6,11]

Obr. 7 popisuje výskyt jednotlivých biogenních aminů ve veltlínském zeleném 2013. Tyto hodnoty byly získány vždy jako průměr ze všech čtyř odběrových míst. Všechny číselné hodnoty jsou přehledně uvedeny v tabulkách v příloze P I.

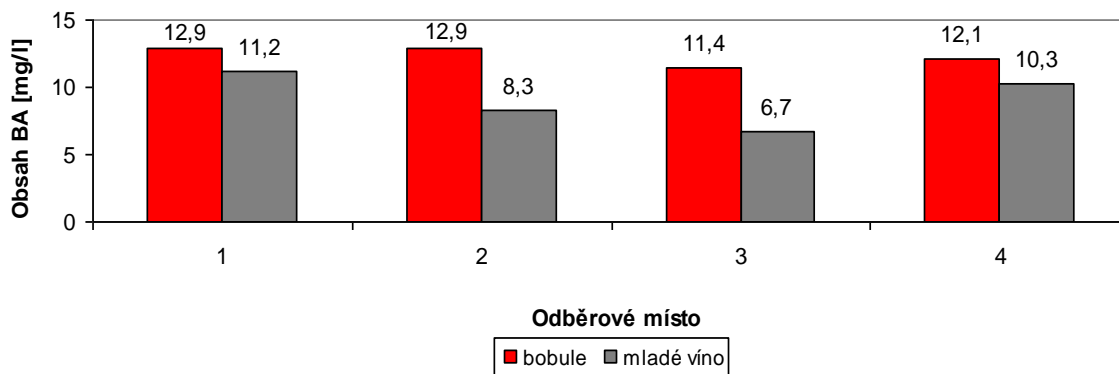


Obr. 7 - Obsah jednotlivých detekovaných biogenních aminů
- veltlínské zelené 2013

V moštu byl detekován pouze spermidin a spermin. Ve fázi 21 a 60 dní po stáčení z kalů byl detekován také tyramin, jehož koncentrace náhle vzrostla ve fázi 90ti dní po stáčení. V této fázi již obsah tyraminu překračuje běžnou hranici jeho koncentrace v bílých vínech, a mohl by již vyvolat mírné zdravotní obtíže, zejména u více senzitivních jedinců. [26,28] Ve fázi 90ti dnů po stáčení z kalů se vyskytoval také fenyletylamin. Podle Edera [28] se jeho koncentrace v bílých vínech pohybuje okolo 13 mg/l, nicméně Soufleros a kol. [26] tvrdí, že již 3 mg/l tohoto aminu mohou způsobit zdravotní potíže. Tato koncentrace však nebyla dosažena.

Koncentrace spermidinu a sperminu ve všech fázích po alkoholovém kvašení dosahovala téměř stejných hodnot. U spermidinu je možné pozorovat dokonce mírný pokles jeho koncentrace. Pokud bylo víno uchováno v dubových sudech, mohl být tento pokles způsoben přítomností fenolických sloučenin ze dřeva sudu, které inhibovaly přítomné dekarboxyláza pozitivní mikroorganizmy. [117,118,120,135,136,138]

Obr. 8 popisuje obsah biogenních aminů veltlínského zeleného 2014 ve všech čtyřech odběrových místech. Hodnoty v každém sloupci jsou sumou všech detekovaných aminů.



Obr. 8 - Obsah biogenních aminů z různých odběrových míst
- veltlínského zeleného 2014

V bobulích veltlínského zeleného 2014 byl u všech odběrových míst detekován vyšší obsah biogenních aminů než u mladého vína. Tyto hodnoty mohou být důkazem nepříliš dobré hygieny během sklizně a přepravy bobulí k analýzám [6,11], nebo mohly být posbírány přezrálé. Důsledkem toho bylo jejich pH mírně vyšší, a mohly tak vzniknout lepší podmínky pro tvorbu biogenních aminů. [3,51,134]

V mladém vínu došlo k poklesu obsahu biogenních aminů. Toto mohlo být způsobeno snížením počtu mikroorganismů, zejména kvasinek, které jsou po alkoholovém kvašení již mrtvé a sedimentují na dno nádoby. [11,77,78] Pokud bylo toto víno skladováno v dubových sudech, mohly koncentraci aminů snížit i fenolické látky obsažené v dubovém dřevě, které mohou ve vyšších koncentracích inhibovat přítomné dekarboxyláza pozitivní mikroorganismy. [117,118,120,135,136,138]

Tab. 14 zobrazuje jednotlivé biogenní aminy, které byly v tomto vzorku detekovány. Koncentrace jednotlivých biogenních aminů této odrůdy a ročníku byly získány vždy jako průměr ze všech čtyř odběrových míst. Veškeré výsledky jsou uvedeny v tabulkách v příloze P II.

Tab. 14 - Obsah jednotlivých detekovaných biogenních aminů
- veltlínské zelené 2014 [mg/l]

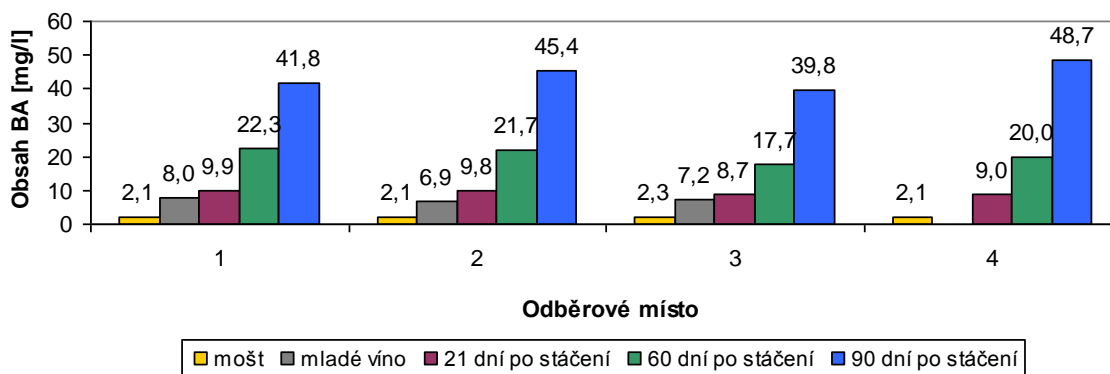
	BOBULE	MLADÉ VÍNO
SPERMIDIN	1,8	0,4
SPERMIN	10,6	3,3
TYRAMIN	---	1,5
PUTRESCIN	---	2,4

V bobulích byl detekován pouze spermidin a spermin. Tento výsledek potvrzují i Lonvaud-Funel a další autoři [3,28,59,74,75,76] kteří tvrdí, že již v hroznech může být detekován zejména spermidin.

V mladém vínu pak k těmto aminům, které se zde vyskytovaly v menším množství než v bobulích, přibyl tyramin a putrescin. Obsah tyraminu se v bílých vínech pohybuje přibližně od 0,1 do 6,5 mg/l, zdravotní problémy může způsobovat až od koncentrace 25 mg/l. Výskyt putrescinu se také pohybuje v běžných hodnotách, které jsou podle Bover-Cida a kol. [28] mezi 0,1 a 4,8 mg/l.

6.2.2 Výsledky stanovení u ryzlinku rýnského

Obr. 9 zobrazuje sumu všech detekovaných biogenních aminů v jednotlivých fázích a odběrových místech odrůdy ryzlink rýnský 2013.



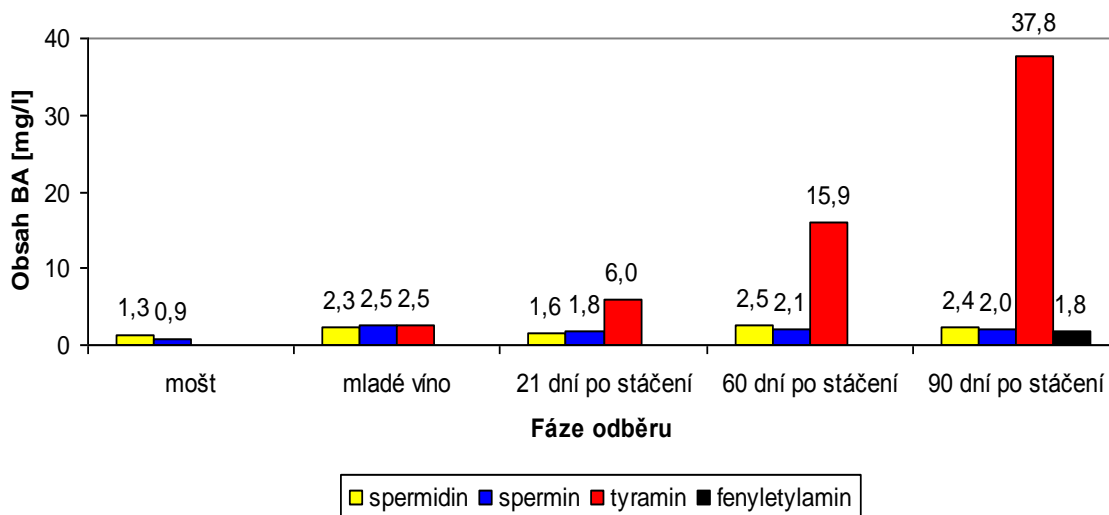
Obr. 9 - Obsah biogenních aminů z různých odběrových míst
- ryzlink rýnský 2013

Pozn.: U odběrového místa č. 4 nebyl získán vzorek mladého vína, porovnávana byla tedy pouze 3 odběrová místa.

U této odrůdy vína byly zaznamenány vyšší hodnoty biogenních aminů než u veltlínského zeleného. Příčinou může být to, že ryzlink se řadí k aromatickým odrůdám, a proto se nechává krátce macerovat. Tím se do moštu extrahuje více aromatických a barevných látek. [6,77,78,88,182] Dalším důvodem může být například nižší odolnost hroznů této odrůdy proti houbovým chorobám, které je oslabují a tím umožňují přístup další mikroflóry, která poté produkuje aminy. Tato domněnka však nebyla potvrzena v žádném odborném článku.

V důsledku prodlužující se doby skladování vína byl u všech odběrových míst během dalších fází výroby zjištěn nárůst počtu biogenních aminů. [6,150] Opět je zde znatelný větší rozdíl mezi obsahem aminů ve fázi 60 dní po stáčení a ve fázi 90 dní po stáčení z kalů. Toto může být vysvětleno horším konzervačním účinkem v důsledku použití nižšího množství disiřičitanu. [77,92]

Obr. 10 zobrazuje koncentrace jednotlivých detekovaných aminů v ryzlinku rýnském 2013. Výsledky v každém sloupci byly získány jako průměr ze všech čtyř odběrových míst. Všechny hodnoty jsou zaneseny také do tabulek v příloze P III.



Obr. 10 - Obsah jednotlivých detekovaných biogenních aminů
- ryzlink rýnský 2013

V moštu byl opět detekován pouze spermidin a spermin, v mladém vínu došlo k jejich nárůstu, a vyskytoval se zde i tyramin, jehož obsah dosahoval běžných hodnot stanovených Ederem [28]. Ve fázi 21 dní po stáčení vína z kalů došlo k mírnému poklesu obsahu spermidinu a sperminu, nicméně v další fázi jejich koncentrace opět mírně vzrostla a v 90ti dnech od stáčení se již neměnila. Koncentrace tyraminu během zrání a skladování neustále rostla, až v poslední fázi dosahovala hodnot, které mohou negativně ovlivnit zdraví člověka. [26] V poslední fázi měření byl detekován také fenyletylamin, jehož koncentrace se pohybovala v běžných hodnotách. [28]

Tab. 15 zobrazuje obsah biogenních aminů v bobulích ryzlinku rýnského 2014. Tyto hodnoty jsou sumou všech detekovaných biogenních aminů. Víno tohoto ročníku nebylo kvůli nepříznivým klimatickým podmínkám vyráběno.

Tab. 15 - Obsah biogenních aminů z různých odběrových míst
- ryzlink rýnský 2014 [mg/l]

	OBSAH BIOGENNÍCH AMINŮ
1. ODBĚROVÉ MÍSTO	12,6
2. ODBĚROVÉ MÍSTO	11,0
3. ODBĚROVÉ MÍSTO	10,9
4. ODBĚROVÉ MÍSTO	9,8

Rozdílná koncentrace biogenních aminů ve všech odběrových místech mohla být způsobena rozdílnými hygienickými podmínkami při získávání nebo převozu bobulí k analýzám. [6,11]

Tab. 16 zobrazuje dva biogenní aminy, které byly v bobulích ryzlinku rýnského 2014 detekovány. Obsah biogenních aminů v této tabulce je průměrnou hodnotou obsahu biogenních aminů ze všech čtyř odběrových míst. Veškeré naměřené hodnoty jsou zaneseny do tabulek v příloze P IV.

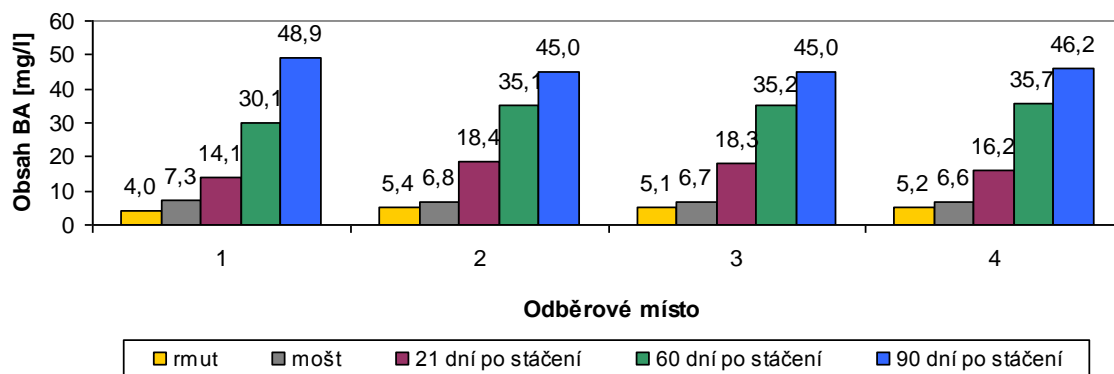
Tab. 16 - Obsah jednotlivých detekovaných biogenních aminů
- ryzlink rýnský 2014 [mg/l]

	BOBULE
SPERMIDIN	1,5
SPERMIN	9,6

V bobulích ryzlinku rýnského 2014 byly detekovány spermidin a spermin. Lonvaud-Funel a další autoři [3,28,59,74,75,76] tvrdí, že v bobulích se téměř vždy vyskytují ve vyšší míře pouze spermidin a putrescin, a ostatní biogenní aminy pouze ve velmi malých množstvích. Toto tvrzení je mírně v rozporu s našimi výsledky, jelikož v bobulích ryzlinku rýnského byla detekována pouze nízká hladina spermidinu, a navíc se zde vyskytoval spermin, jehož koncentrace byla více než 6x vyšší.

6.2.3 Výsledky stanovení u rulandského modrého

Obsah biogenních aminů v rulandském modrém 2013 je zobrazen na obr. 11. Hodnoty ve všech sloupcích tohoto grafu jsou sumou detekovaných biogenních aminů.

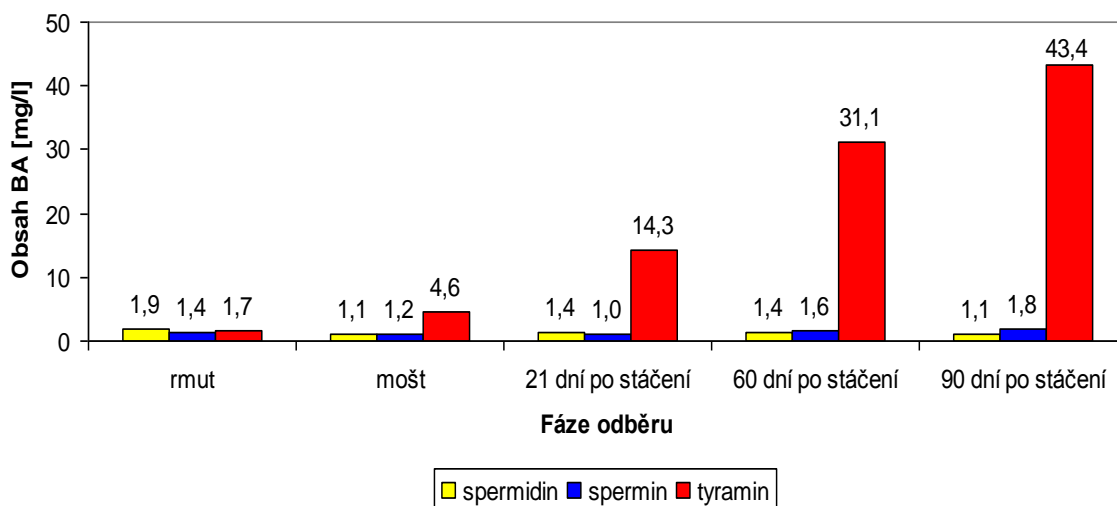


Obr. 11 - Obsah biogenních aminů z různých odběrových míst
- rulandské modré 2013

Přítomnost biogenních aminů byla zaznamenána již ve rmutu, což jsou rozdrčené bobule, které jsou ponechány maceraci. Koncentrace biogenních aminů rostly s postupující fází výroby (dobou skladování) [6,150].

U vína odrůdy rulandské modré byly zaznamenány nejvyšší hodnoty biogenních aminů ze všech tří zkoumaných odrůd. Je to v důsledku toho, že při nakvašování je doba styku moštu se slupkami bobulí nejdéší, z důvodu žádoucí extrakce aromatických, ale hlavně barevných, látek. V důsledku toho se do moštu dostalo také nejvíce mikroorganismů. [6,77,78,88] Vysoký obsah aminů může být také důsledkem malolaktického kvašení, při kterém dochází k mírnému vzestupu hodnoty pH. Při vyšším pH jsou pak lepší podmínky pro růst dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů. [3,51,134]

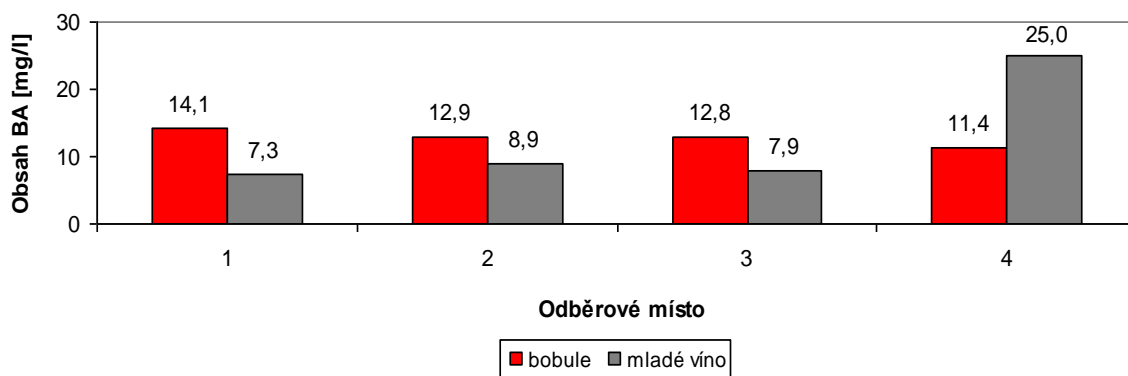
Obr. 12 zobrazuje všechny biogenní aminy, které byly v jednotlivých fázích u rulandského modrého 2013 detekovány. Tyto hodnoty byly získány jako průměr ze všech čtyř odběrových míst. Všechny výsledky jsou přehledně utříděny do tabulek v příloze P V.



Obr. 12 - Obsah jednotlivých detekovaných biogenních aminů
- rulandské modré 2013

Ve všech fázích výroby vína byly detekovány 3 biogenní aminy, a to spermidin, spermin a tyramin. Koncentrace spermidinu a sperminu byly ve všech fázích na stejné úrovni, množství tyraminu se však s postupující fází výroby zvyšovalo. Ve fázi 21 dní po stáčení z kalů byla tato hodnota vyšší než obvykle v červených vínech podle Edera [28] bývá. Po 90ti dnech odstáčení z kalů dosáhla koncentrace tyraminu 43,4 mg/l. Tato koncentrace dokonce přesáhla hodnoty stanovené Souflerosem a kol. [26], které mohou u některých jedinců vyvolat nežádoucí zdravotní účinky.

Obr. 13 popisuje koncentraci biogenních aminů v rulandském modrém 2014. Hodnoty v tomto grafu jsou vždy sumou všech detekovaných biogenních aminů.



Obr. 13 - Obsah biogenních aminů z různých odběrových míst
- rulandské modré 2014

Obsah biogenních aminů v bobulích byl ve třech fázích ze čtyř vyšší než v mladém vínu. Klesající koncentrace mohly být způsobeny skladováním vína v dubových sudech, jejichž fenolické látky ze dřeva mohou inhibovat některé dekarboxyláza pozitivní mikroorganismy. [117,118,120,135,136,138] Vyšší koncentrace aminů v mladém vínu u 4. odběrového místa mohla být způsobena kontaminací skladovací nádoby nebo během přepravy k analýze. [6,11]

Tab. 17 zobrazuje, které biogenní aminy byly detekovány v bobulích a mladém vínu. Tyto hodnoty byly získány jako průměr ze všech čtyř odběrových míst. Obsahy biogenních aminů z každého odběrového místa jsou také zaneseny do tabulek v příloze P VI.

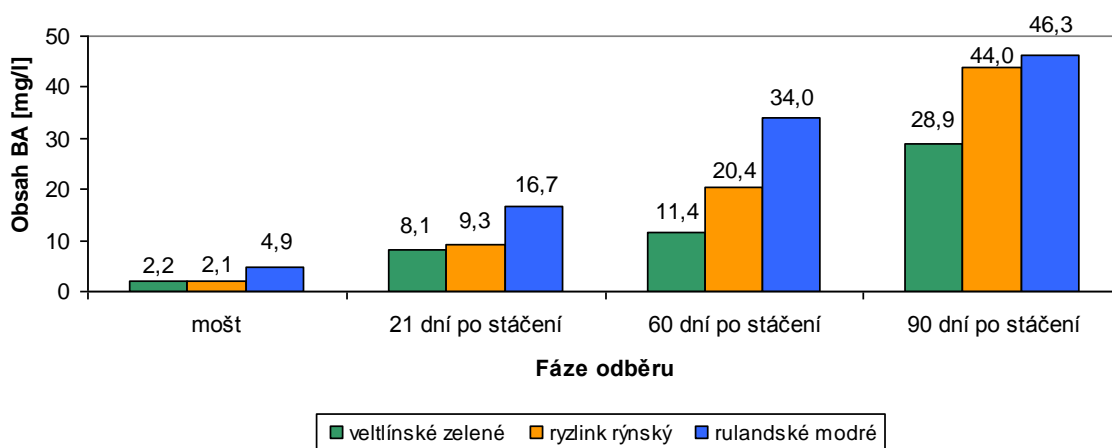
Tab. 17 - Obsah jednotlivých detekovaných biogenních aminů
- rulandské modré 2014 [mg/l]

	BOBULE	MLADÉ VÍNO
SPERMIDIN	2,0	0,6
SPERMIN	10,8	3,7
TYRAMIN	---	1,4
PUTRESCIN	---	2,1

V bobulích rulandského modrého 2014 byly detekovány pouze spermidin a spermin, opět v koncentracích opačných než tvrdí Lonvaud-Funel a další autoři [3,28,59,74,75,76]. Ve fázi mladého vína byl vedle těchto biogenních aminů detekován také tyramin a putrescin. Eder [28] tvrdí, že v červených vínech bývá obsah tyraminu od 0,1 do 8,0 mg/l, koncentrace putrescinu se podle něj pohybuje mezi 0,9 až 35,0 mg/l.

6.2.4 Porovnání obsahu biogenních aminů mezi jednotlivými odrůdami

Obr. 14 porovnává koncentrace biogenních aminů v jednotlivých fázích výroby, a také mezi odrůdami ročníku 2013. Hodnota v každém sloupci grafu je průměrným číslem ze všech čtyř odběrových míst dané fáze a odrůdy.



Obr. 14 - Porovnání obsahů biogenních aminů mezi odrůdami - 2013

Porovnáme-li fáze odběrů všech tří odrůd, je patrné, že veltlínské zelené v drtivé většině případů obsahovalo nejméně biogenních aminů. Následně obsah aminů postupně vzrůstal, jelikož se prodlužovala doba skladování. [6,150] Po 90ti dnech od stáčení vína z kalů byl obsah aminů v rulandském modrém jen o několik jednotek mg/l vyšší než u ryzlinku rýnského v téže fázi. Jak již bylo zmíněno výše, je to z toho důvodu, že obě odrůdy byly ponechány nakvašování na slupkách bobulí, byť u ryzlinku byla tato doba výrazně kratší. [6,77,78,88]

Tab. 18 porovnává obsahy biogenních aminů mezi odrůdami ročníku 2014. Jednotlivé hodnoty biogenních aminů v této tabulce jsou průměrným číslem ze všech čtyř odběrových míst.

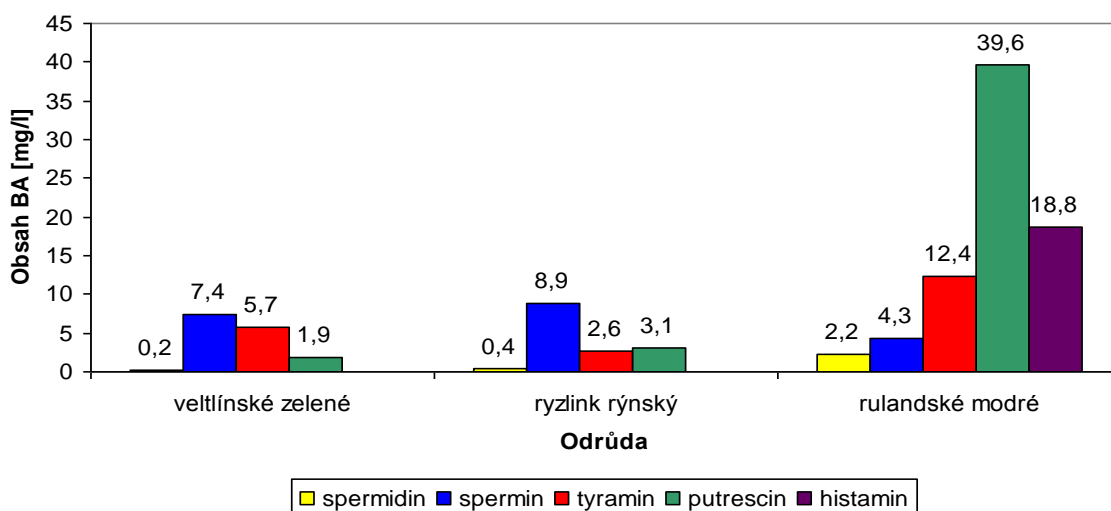
Tab. 18 - Porovnání obsahu biogenních aminů mezi odrůdami - 2014 [mg/l]

	BOBULE	MLADÉ VÍNO
VELTLÍNSKÉ ZELENÉ	12,3	9,1
RYZLINK RÝNSKÝ	11,1	---
RULANDSKÉ MODRÉ	12,8	12,3

Obsah biogenních aminů byl v bobulích u veltlínského zeleného i rulandského modrého vyšší než v mladém vínu. Snížení jejich koncentrace mohlo být zapříčiněno např. skladováním vína v dubových sudech, jejichž fenolické látky mohou inhibovat některé mikroorganismy, které mají dekarboxylační schopnost. [117,118,120,135,136,138] Je také možné, že v mladém vínu ještě neproběhlo malolaktické kvašení v takové míře, aby došlo ke zvýšení pH, které více podporuje dekarboxylační aktivitu mikroorganismů. [3,51,134]

6.2.5 Porovnání obsahu biogenních aminů mezi víny zařazenými do sledování v průběhu výroby a komerčními víny

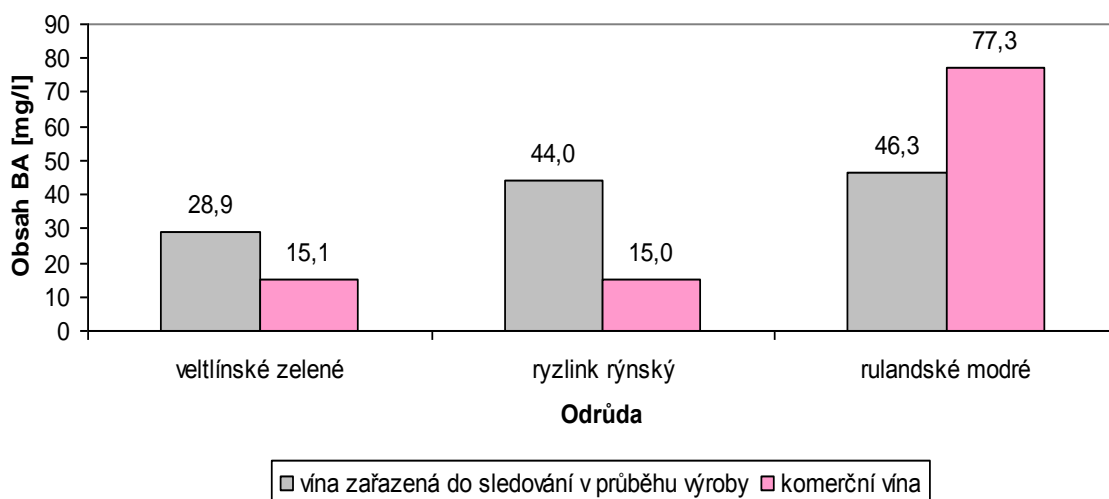
Obr. 15 popisuje obsah jednotlivých aminů, které byly detekovány v komerčních vínech ročníku 2013. Všechny naměřené hodnoty jsou zapsány i v tabulce v příloze P VII.



Obr. 15 - Obsah jednotlivých detekovaných biogenních aminů v komerčních vínech 2013

Ve všech třech odrůdách byl detekován spermidin, spermin, tyramin a putrescin. Koncentrace spermidinu byla u bílých odrůd nižší než u rulandského modrého, oproti tomu koncentrace sperminu zde byly vyšší. Hodnoty obsahu tyraminu byly proměnlivé, avšak stejně jako i obsah putrescinu odpovídaly rozsahům v bílých vínech stanoveným Ederem [28]. V rulandském modrém byly koncentrace tyraminu i putrescinu nad běžnou koncentrací. [28] Byla zde navíc zjištěna i přítomnost histaminu, který může podle některých zdrojů vyvolávat nežádoucí zdravotní účinky již v koncentracích od 8 do 20 mg/l. Jsou-li přítomny i další aminy, jako je spermidin, spermin či putrescin, mohou být negativní zdravotní účinky histaminu ještě zesíleny. [6,26,50,51,52,58,59,60,61,62] Je tedy možné, že u některých jedinců může tato koncentrace histaminu vyvolat mírné zdravotní obtíže. Nicméně v současnosti neplatí na území České republiky žádné nařízení omezující obsah histaminu ani jiných aminů ve víně, víno tedy nepřekračuje žádné legislativní limity. [65]

Obr. 16 porovnává obsah biogenních aminů mezi víny, která byla zařazena do sledování v průběhu výroby, a mezi komerčními víny. Jako hodnoty u vín zařazených do sledování v průběhu výroby byly vzaty koncentrace biogenních aminů ve fázi 90ti dní po stáčení. Koncentrace biogenních aminů v komerčních vínech jsou sumou jednotlivých detekovaných aminů.



Obr. 16 - Porovnání obsahu biogenních aminů mezi víny zařazenými do sledování v průběhu výroby a komerčními víny 2013

U bílých odrůd byly koncentrace aminů vyšší ve vínech zařazených do sledování. Zde mohlo mít vliv množství použitého disířičitanu při síření. Sířením jsou inhibovány dekarboxyláza pozitivní mikroorganismy. Vyšší počet aminů u BIO vín tedy mohl být způsoben tím, že je v těchto vínech méně SO₂ než u vín sířených běžnými dávkami disířičitanu. [77,92] Výjimkou je rulandské modré, kde byl obsah biogenních aminů větší ve víně komerčním. Zde může být nárůst aminů zdůvodněn vyšší extrakcí mikroorganismů a živin během macerace, nebo může být ovlivněn hygienou výrobního procesu. [6,11,77,78,88]

Žádný z analyzovaných vzorků vín v této diplomové práci nepřekračoval horní hranici celkového obsahu biogenních aminů ve vínech (130 mg/l), kterou stanovují Křížek a Pelikánová [30].

ZÁVĚR

V diplomové práci byla sledována změna obsahu biogenních aminů v průběhu výroby vína se sníženým obsahem oxidu siřičitého. Zároveň byl prováděn mikrobiologický rozbor těchto vzorků se zaměřením na skupiny mikroorganismů, které mohly být schopny biogenní aminy vytvářet. Pro porovnání naměřených hodnot byly k analýzám použity také komerční vzorky vín stejných odrůd a ročníku sběru. Ze zjištěných výsledků lze vyvodit tento závěr:

- Na četnost a diverzitu mikrobiální populace v hroznech a ve víně mají vliv nejen klimatické podmínky, ve kterých byla réva pěstována, ale i hygienické podmínky během sběru, převozu, zpracování i skladování mladého vína. Důležitými faktory, které růst mikroorganismů ovlivňují, jsou také teplota, pH nebo obsah alkoholu, a mnoho dalších faktorů. Snížené dávky siřičího prostředku mají za následek menší počet inhibovaných dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů.
- Počet mikroorganismů klesá s postupující fází výroby vína, zejména vzhledem ke změnám obsahu některých látek ve vzorcích.
- Obsah biogenních aminů byl ovlivněn právě přítomností dekarboxyláza pozitivní mikroflóry, a výše zmíněnými vlivy, které na ni působí. Koncentrace aminů se během výroby a doby skladování vína postupně zvyšovala, podíl na jejich počtu měla i teplota během skladování. Největší vliv na dekarboxylaci volných aminokyselin mají bakterie mléčného kvašení, díky kterým dochází v mladém víně k malolaktickému kvašení. Po této fázi navíc dochází k mírnému vzestupu pH, čímž dochází k podpoře rozvoje dalších přítomných mikroorganismů.
- Výskyt některých biogenních aminů byl zaznamenán již v bobulích. Nejvyšší koncentrace biogenních aminů byly zaznamenány v červeném víně, jelikož zde došlo k nejdelší maceraci, která měla za následek extrakci nejen vyššího množství fenolických a barevných látek, ale i živin a mikroorganismů přítomných na bobulích.
- Vliv na obsah těchto dusíkatých látek mají také úpravy moštu a vína během výroby, jako je doba kontaktu mladého vína s kaly, čiření, filtrace, a také druh nádoby, ve které je víno uchováváno.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ANLI, R. E. a M. BAYRAM. Biogenic Amines in Wines. *Food Reviews International*. New York, N.Y.: M. Dekker, c1985-, č. 25, s. 86-102.
- [2] IBE, A., T. NISHIMA a N. KASAI. Formation of Tyramine and Histamine during Soybean Paste (Miso) Fermentation. *Eisei kagaku* [online]. 1992, vol. 38, issue 2, s. 181-187 [cit. 2015-04-05]. DOI: 10.1248/jhs1956.38.181. Dostupné z: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jhs1956/38/2/38_2_181/_pdf
- [3] LONVAUD-FUNEL, A. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2001, vol. 199, issue 1, s. 9-13 [cit. 2015-04-05]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10643.x. Dostupné z: <http://femsle.oxfordjournals.org/content/199/1/9>
- [4] SUZZI, G. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2003, vol. 88, issue 1, s. 41-54 [cit. 2015-04-05]. DOI: 10.1016/s0168-1605(03)00080-1.
- [5] LORET, S., P. DELOYER, G. DANDRIFOSSE, M. V. MORENO-ARRIBAS, A. Y. SMIT, M. du TOIT a A. ZOTOU. Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: Data from Belgian samples. *Food Chemistry*. 2005, vol. 89, issue 4, s. 1031-1041. DOI: 10.1016/b978-0-12-373891-2.00100-0.
- [6] MORENO-ARRIBAS, M a M POLO. *Wine chemistry and biochemistry*. New York: Springer, c2009, xv, 735 p. ISBN 9780387741185-.
- [7] VANDEKERCKHOVE, P. AMINES IN DRY FERMENTED SAUSAGE. *Journal of Food Science*. 1977, vol. 42, issue 1, s. 63-88. DOI: 10.1002/9780470385111.ch4.
- [8] ARENA, M.E. a M. C. M. de NADRA. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2001, vol. 90, issue 2, s. 158-162 [cit. 2015-04-05]. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01223.x. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2001.01223.x/full>
- [9] SMĚLÁ, D., P. PECHOVÁ, T. KOMPRDA, B. KLEJDUS a V. KUBÁŇ. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace.

- tace a skladování. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2004, č. 98, s. 432-437.
- [10] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-866-5903-8.
- [11] SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. *Journal of Food Microbiology*. 1996, vol. 29, 2-3, s. 213-231. DOI: 10.1128/9781555815936.ch16.
- [12] Spermine Biosynthesis. *INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: Recommendations on Biochemical & Organic Nomenclature, Symbols & Terminology etc.* [online]. London, 20 October 2008, 23 December 2014 [cit. 2015-04-06]. Dostupné z: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/reaction/misc/spermine.html>
- [13] ADÁMKOVÁ, Š. a M. PETŘIVALSKÝ. Vztah metabolismu a signálních funkcí oxidu dusnatého a polyaminů v rostlinách. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2012, č. 106, s. 166-173 [cit. 2015-04-06]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_03_166-173.pdf
- [14] ZÁLEŠÁKOVÁ, L. *Monitoring obsahu biogenních aminů ve vybraných fermentovaných potravinách živočišného původu*. Zlín, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [15] HALÁSZ, A., Á. BARÁTH, L. SIMON-SARKADI, W. HOLZAPFEL, M. VINCENZINI, S. GUERRINI, S. MANGANI a L. GRANCHI. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science*. 1994, vol. 5, issue 2, s. 167-180. DOI: 10.1007/978-3-540-85463-0_9.
- [16] YONGMEI, L., L. XIN, Ch. XIAOHONG, J. MEI, L. CHAO a D. MINGSHENG. A survey of biogenic amines in Chinese rice wines. *Food Chemistry*. 2007, vol. 100, issue 4, s. 1424-1428. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.11.035.
- [17] GLORIA, M. B. A., B. T. WATSON, L. SIMON-SARKADI a M. A. DAESCHEL. A survey of biogenic amines in Oregon Pinot Noir and Cabernet Sauvignon wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1998, 49 (3), s. 279-282.

- [18] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 1*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-866-5903-8.
- [19] ASKAR, A. a H. TREPTOW. Biogene Amine in Lebensmitteln: Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. 1986, č. 6.
- [20] VIDAL-CAROU, M. C., A. AMBATLLE-ESPUNYES, M. C. ULLA-ULLA a A. MARINE-FONT. Histamine and tyramine in Spanish wines: Their formation during the winemaking process. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1990, č. 41, s. 160-167.
- [21] HAJOS, G., A. SASS-KISS, E. SZERDAHELYI a S. BARDOCZ. Changes in Biogenic Amine Content of Tokaj Grapes, Wines, and Aszu-wines. *Journal of Food Science*. 2000, vol. 65, issue 7, s. 1142-1144. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2000.tb10254.x.
- [22] HERNÁNDEZ-ORTE, P., J. F. CACHO a V. FERREIRA. Relationship between Varietal Amino Acid Profile of Grapes and Wine Aromatic Composition. Experiments with Model Solutions and Chemometric Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, vol. 50, issue 10, s. 2891-2899. DOI: 10.1021/jf011395o.
- [23] ANLI, R. E., N. VURAL, S. YILMAZ a Ỗ. H. VURAL. The determination of biogenic amines in Turkish red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2004, vol. 17, issue 1, s. 53-62. DOI: 10.1016/s0889-1575(03)00104-2.
- [24] VIDAL-CAROU, M. C., R. CODONY-SALCEDO a A. MARINE-FONT. Changes in the concentration of histamine and tyramine during wine spoilage at various temperatures. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1991, č. 42, s. 145-149.
- [25] LANDETE, J. M., S. FERRER a I. PARDO. Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine?. *Journal of Applied Microbiology*. 2005, vol. 99, issue 3, s. 580-586. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02633.x.
- [26] SOUFLEROS, E., M. L. BARRIOS a A. BERTRAND. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1998, č. 49, s. 266-278.

- [27] MORENO-ARRIBAS, V., S. TORLOIS, A. JOYEUX, A. BERTRAND a A. LONVAUD-FUNEL. Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. *Journal of Applied Microbiology*. 2000, vol. 88, issue 4, s. 584-593. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00997.x.
- [28] EDER, R. *Vady vína*. Vyd. 1. Valtice: Národní vinařské centrum, 2006, 263 s. ISBN 80-903-2016-3.
- [29] BOVER-CID, S., M. IZQUIERDO-PULIDO, A. MARINE-FONT a M. C. VIDAL-CAROU. Biogenic mono-, di- and polyamine contents in Spanish wines and influence of a limited irrigation. *Food Chemistry*. 2006, vol. 96, issue 1, s. 43-47. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.01.054.
- [30] KRÍŽEK, M. a T. PELIKÁNOVÁ. Biogenic Amines in Food. *Journal of Chromatography*. New York: Elsevier, 1998, č. 815.
- [31] SOUZA, S. C., K. H. THEODORO, É. R. SOUZA, S. DA MOTTA a M. B. A. GLÓRIA. Bioactive amines in Brazilian wines: types, levels and correlation with physico-chemical parameters. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online]. 2005, vol. 48, issue 1, s. 53-62 [cit. 2015-04-06]. DOI: 10.1590/s1516-89132005000100009. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-89132005000100009&script=sci_arttext
- [32] KISS, J., M. KORBÁSZ a A. SASS-KISS. Study of Amine Composition of Botrytized Grape Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, vol. 54, issue 23, s. 8909-8918. DOI: 10.1021/jf061578g.
- [33] GOŇI, D. T. a C. A. AZPILICUETA. Influence of Yeast Strain on Biogenic Amines Content in Wines: Relationship with the Utilization of Amino Acids during Fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2001, č. 52.
- [34] LEUSCHNER, R. G. K., R. KURIHARA a W. P. HAMMES. Effect of enhanced proteolysis on formation of biogenic amines by lactobacilli during Gouda cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, vol. 44, 1-2, s. 15-20. DOI: 10.1016/s0168-1605(98)00118-4.
- [35] NEAMAT-ALLAH, A. A. Biogenic Amines in Karish and Mish Cheese in Egypt. *Egyptian Journal Dairy Sd*. 1999, č. 25, s. 337-348.

- [36] ABABOUC, L., M. E. AFILAL, H. BENABDELJELIL a F. F. BUSTA. Quantitative changes in bacteria, amino acids and biogenic amines in sardine (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25-28°C) and in ice. *International Journal of Food Science*. 1991, vol. 26, issue 3, s. 297-306. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1991.tb01166.x.
- [37] ABD-ALLA, E. A. M., K. EL-SHAFEI, G. A. IBRAHIM a O. M. SHARAF. Changes in microflora and biogenic amines of some market processed cheeses during storage. *Egypt Journal Dairy Sc.* 1996, č. 24, s. 217-226.
- [38] BUNČIĆ, S., Lj. PAUNOVIĆ, V. TEODOROVIĆ, D. RADIŠIĆ, G. VOJINOVIĆ, D. SMILJANIĆ a M. BALTIĆ. Effects of gluconodeltalactone and *Lactobacillus plantarum* on the production of histamine and tyramine in fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 1993, vol. 17, issue 4, s. 303-309. DOI: 10.1016/0168-1605(93)90200-z.
- [39] HERNANDEZ-HERRERO, M. M., A. X. ROIG-SAGUES, J. J. RODRIGUEZ-JEREZ a M. T. MORA-VENTURA. Halotolerant and Halophilic Histamine-Forming Bacteria Isolated during the Ripening of Salted Anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *Journal of Food Protection*. Ames, Iowa: International Association of Milk, Food, and Environmental Sanitarians, 1999, č. 62, s. 509-514.
- [40] KIM, S. H., H. AN a R. J. PRICE. Histamine Formation and Bacterial Spoilage of Albacore Harvested off the U.S. Northwest Coast. *Journal of Food Science*. 1999, vol. 64, issue 2, s. 340-343. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1999.tb15896.x.
- [41] BOVER-CID, S., M. IZQUIERDO-PULIDO a M. C. VIDAL-CAROU. Effect of proteolytic starter cultures of *Staphylococcus* spp. on biogenic amine formation during the ripening of dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, vol. 46, issue 2, s. 95-104. DOI: 10.1016/s0168-1605(98)00170-6.
- [42] SILVA, C. C. G., D. J. B. PONTE a M. L. N. E. DAPKEVICIUS. Storage Temperature Effect on Histamine Formation in Big Eye Tuna and Skipjack. *Journal of Food Science*. 1998, vol. 63, issue 4, s. 644-647. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1998.tb15803.x.

- [43] TEODOROVIC, V. a S. BUNCIC. The effect of pH on tyramine content in fermented sausages. *Fleischwirtsch.* 1999, č. 79, s. 85-88.
- [44] TEODOROVIC, V. B., S. BUNCIC a D. SMILJANIC. A study of factors influencing histamine production in meat. *Fleischwirtsch.* 1994, č. 74, s. 181-183.
- [45] TIECCO, G., G. TANTILLO, E. FRANCIOSO, A. PAPARELLA a D. NATALE. Qualitative and quantitative determination of some biogenic amines in sausages during ripening. *Industria alimenticia.* 1986, č. 25, s. 209-213.
- [46] VIDAL-CAROU, M. C., M. L. IZQUIERDO-PULIDO, M. C. MARTÍN-MORRO, MARINÉ-FONT. Histamine and tyramine in meat products: Relationship with meat spoilage. *Food Chemistry.* 1990, vol. 37, issue 4, s. 508-513. DOI: 10.1016/b978-0-12-384730-0.00196-8.
- [47] LEUSCHNER, R. G. K. a W. P. HAMMES. Degradation of histamine and tyramine by *Brevibacterium linens* during surface ripening of Munster cheese. *Journal of Food Protection.* Ames, Iowa: International Association of Milk, Food, and Environmental Sanitarians, 1998, č. 61, s. 874-878.
- [48] LEUSCHNER, R. G. K. a W. P. HAMMES. Tyramine degradation by micrococci during ripening of fermented sausage. *Meat Science.* 1998, vol. 49, issue 3, s. 289-296. DOI: 10.1016/s0309-1740(97)00124-1.
- [49] VIDAL-CAROU, M. C., R. CODONY-SALCEDO a A. MARINÉ-FONT. Histamine and tyramine in spanish wines: Relationships with total sulfur dioxide level, volatile acidity and malo-lactic fermentation intensity. *Food Chemistry.* 1990, vol. 35, issue 3, s. 217-227. DOI: 10.1016/0308-8146(90)90035-3.
- [50] MARCOBAL, A., B. DE LAS RIVAS a R. MUÑOZ. Methods for the Detection of Bacteria Producing Biogenic Amines on Foods: A Survey. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.* 2006, vol. 1, issue 3, s. 187-196. DOI: 10.1007/s00003-006-0035-0.
- [51] BODMER, S., C. IMARK, M. KNEUBÜHL, BENJAKUL. Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. *Inflammation Research.* 1999, vol. 48, issue 6, s. 820-832. DOI: 10.1002/9781118308035.ch43.

- [52] VAUGHAN, A., T. O'SULLIVAN, D. SINDEREN. Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer - A Review. *Journal of the Institute of Brewing*. 2005, vol. 111, issue 4, s. 163-183. DOI: 10.1016/b978-0-12-669201-3.00005-1.
- [53] TAŤÁKOVÁ, M. *Dekarboxylázová aktivita bakterie Serratia marcescens v kyselém prostředí*. Zlín, 2012. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [54] JANOUSHKOVÁ, M. *Biogenní aminy*. Brno, 2010. Bakalářská práce. Masarykova univerzita.
- [55] HOTAMISLIGIL, G. S. a X. O. BREAKFIELD. Human monoamine oxidase A gene determines levels of enzyme activity. *US National Library of Medicine: National Institutes of Health* [online]. 1991, 49 (2), s. 383-392 [cit. 2015-04-06]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1683299/>
- [56] MAOA. *Genetics Home Reference* [online]. 2015, March 30 [cit. 2015-04-06]. Dostupné z: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MAOA>
- [57] ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 2007, vol. 103, issue 4, s. 203-236. DOI: 10.1016/s0167-9244(08)70291-9.
- [58] DE BORBA, B. M. a J. S. ROHRER. Determination of biogenic amines in alcoholic beverages by ion chromatography with suppressed conductivity detection and integrated pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*. 2007, vol. 1155, issue 1, s. 22-30. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.01.114.
- [59] MILLÁN, S., M. C. SAMPEDRO, N. UNCETA, M. A. GOICOLEA a R. J. BARRIO. Simple and rapid determination of biogenic amines in wine by liquid chromatography–electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2007, vol. 584, issue 1, s. 145-152. DOI: 10.1016/j.aca.2006.10.042.
- [60] GAFNER, J. Biogenic amines in wine: 32nd Annual; New York Wine Industry Workshop. *Proceedings of the 13th International Enology Symposium in Montpellier, France*. 2002, č. 32, s. 95-106.

- [61] LITTLEWOOD, J. T., V. GLOVER, P. T. G. DAVIES, C. GIBB, M. SANDLER a F. C. ROSE. RED WINE AS A CAUSE OF MIGRAINE. *The Lancet*. 1988, vol. 331, issue 8585, s. 558-559. DOI: 10.1016/s0140-6736(88)91353-0.
- [62] GARDINI, F., A. ZACCARELLI, N. BELLETTI, F. FAUSTINI, A. CAVAZZA, M. MARTUSCELLI, D. MASTROCOLA a G. SUZZI. Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. *Food Control*. 2005, vol. 16, issue 7, s. 609-616. DOI: 10.1016/j.foodcont.2004.06.023.
- [63] CARUSO, M., C. FIOREL, M. CONTURSI, G. SALZANO, A. PAPARELLA a P. ROMANO. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. *World Journal of Microbiology*. Oxford, UK: Rapid Communications of Oxford Ltd. in association with UNESCO and in collaboration with the International Union of Microbiological Societies, 2002, č. 18, s. 159-163.
- [64] TEN BRINK, B., C. DAMINK, H. M. L. J. JOOSTEN, J. H. J. HUIS IN'T VELD, FRANZ FRANZEN a KURT EYSELL. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1990, vol. 11, issue 1, s. 92-128. DOI: 10.1016/b978-0-08-013877-0.50007-7.
- [65] MARQUES, A. P., M. C. LEITÃO a M. V. SAN ROMÃO. Biogenic amines in wines: Influence of oenological factors. *Food Chemistry*. 2008, vol. 107, issue 2, s. 853-860. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.09.004.
- [66] LEHTONEN, P. Determination of amines and amino acids in wine - a review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1996, č. 47, s. 127-133.
- [67] MILLIES, K. D. a D. ZIMLICH. Histamingehalte von Weinen und Schaumweinen. *Die Weinwirtschaft: Technik*. Neustadt an der Weinstrasse: Deutscher Weinwirtschaftsverlag, 1988, č. 1, s. 21-24.
- [68] STANDAROVÁ, E., I. BORKOVCOVÁ a L. VORLOVÁ. Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. *Veterinářství*. 2008, č. 58, s. 735-739.
- [69] GUERRINI, S., S. MANGANI, L. GRANCHI a M. VINCENZINI. Biogenic Amine Production by *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology*. 2002, vol. 44, issue 5, s. 374-378. DOI: 10.1007/s00284-001-0021-9.

- [70] BOU, M. et al. *Malolactic fermentation in wine: understanding the science and the practice*. Montréal: Lallemand, 2005. ISBN 09-739-1470-X.
- [71] DU TOIT, W. J., J. MARAIS, I. S. PRETORIUS a M. DU TOIT. Oxygen in Must and Wine: A review. In: <Http://www.sawislibrary.co.za> [online]. 2006 [cit. 2015-04-06]. Dostupné z: <http://www.sawislibrary.co.za/dbtextimages/dutoitwj1.pdf>
- [72] CARRASCOSA SANTIAGO, A. V., R. MUÑOZ a R. GONZÁLEZ GARCIA. *Molecular wine microbiology*. 1st. ed. Boston: Academic Press, 2011, vii, 363 p. ISBN 01-237-5021-0.
- [73] RIBÉREAU-GAYON, P., D. DUBOURDIEU a B. DONÈCHE. *Handbook of enology* [online]. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, c2006-, 2 v. [cit. 2015-04-06]. ISBN 04-700-1037-1. Dostupné z: http://www.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=4fr3NtDn6l0C&oi=fnd&pg=PR5&dq=Handbook+of+Enology:+Microbiology+of+Wine+and+Vinifications&ots=cWGJj6KZse&sig=nXrJ90LB5TikjJ4A37wHvgBNhLo&redir_esc=y#v=onepage&q=Handbook%20of%20Enology%3A%20Microbiology%20of%20Wine%20and%20Vinifications&f=false
- [74] HERBERT, P., M. J. CABRITA, N. RATOLA, O. LAUREANO a A. ALVES. Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage. *Journal of Food Engineering*. 2004, č. 66, s. 315-322. DOI: 10.1016/s0260-8774(04)00154-2.
- [75] LIU, S.-Q. a G. J. PILONE. A REVIEW: Arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance. *Journal of Applied Microbiology*. 1998, vol. 84, issue 3, s. 315-327. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1998.00350.x.
- [76] ANCÍN-AZPILICUETA, C., A. GONZÁLEZ-MARCO a N. JIMÉNEZ-MORENO. Current Knowledge about the Presence of Amines in Wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008, vol. 48, issue 3, s. 257-275. DOI: 10.1080/10408390701289441.
- [77] STEIDL, Robert. *Sklepní hospodářství*. V českém jazyce vyd. 2., aktualiz. Překlad Jiří Sedlo. Valtice: Národní vinařské centrum, 2010, 309 s. ISBN 978-80-903201-9-2.

- [78] JACKSON, R. S. *Wine science: Principles and applications* [online]. San Diego: Academic Press, c1994, xiii, 475 p. [cit. 2015-04-06]. Second Edition. ISBN 01-237-9060-3. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780123790620>
- [79] MALÍK, F. *Vinársky rok*. 1. vyd. Bratislava: Veda, 1989, 266 p., [32] p. of plates. ISBN 80-224-0015-7.
- [80] KOVÁČ, J a kol. *Spracovania hrozna: Učebnica pre 2. a 3. ročník SPoŠ a SOU*. 1. vyd. Bratislava: Príroda, 1990. ISBN 80-070-0313-4.
- [81] KOHOUT, F. *O víně*. Praha: Merkur, 1986. ISBN 51-387-82.
- [82] LANGMAIER, F. *Nauka o zboží*. 3. nezměněné vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2004, 144 s. ISBN 80-731-8173-8.
- [83] KRAUS, V., V. HUBÁČEK a P. ACKERMANN. *Rukověť vinaře*. 2., dopl. vyd. Praha: Brázda, 2004, 267 s., [12] s. barev. obr. příl. ISBN 80-209-0327-5.
- [84] FELŠÖCIOVÁ, S., L. RYBÁRIK, D. TANČINOVÁ, Z. MAŠKOVÁ a M. KAČÁNIOVÁ. Microfungi and mycotoxins of grapes from Eastern Slovak wine region. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* [online]. 2015, vol. 04, Special 01, s. 12-15 [cit. 2015-04-06]. DOI: 10.15414/jmbfs.2015.4.special1.12-15. Dostupné z: http://tk.uni-sz.bg/files/E7_et_al.pdf
- [85] LONVAUD-FUNEL, A. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek*. Dordrecht [etc.]: Kluwer Academic Publishers [etc.], 1999, č. 76, s. 317-331.
- [86] Analysis of yeasts populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1997, č. 48, s. 339-344.
- [87] MORTIMER, R. a M. POLSINELLI. On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology*. 1999, vol. 150, issue 3, s. 199-204. DOI: 10.1016/s0923-2508(99)80036-9.
- [88] MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J., Á. MARCOBAL, C. POLO a M. V. MORENO-ARRIBAS. Influence of technological practices on biogenic amine contents in red

- wines. *European Food Research and Technology*. 2005, vol. 222, 3-4, s. 420-424. DOI: 10.1007/s00217-005-0142-7.
- [89] FLEET, G. H. The microorganisms of winemaking – isolation, enumeration and identification. *Wine microbiology and biotechnology*. Philadelphia, Pa.: Harwood Academic Publishers, c1993, s. 1-25.
- [90] VAN SCHOTHORST, M. *Microorganisms in foods 6: Microbial ecology of food commodities*. New York: Blackie Academic, 1997, p. 716-723. ISBN 0-306-48676-8.
- [91] MARCOBAL, Á., P. J. MARTÍN-ÁLVAREZ, M. C. POLO, R. MUÑOZ a M. V. MORENO-ARRIBAS. Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. *Journal of Food Protection*. 2006, č. 2, s. 252-468.
- [92] GARDE-CERDÁN, T., M. ARIAS-GIL a P. ROMANO. Formation of biogenic amines through spontaneous and inoculated wine alcoholic fermentations: effect of SO₂. *Food Control*. 2007.
- [93] LAFON-LAFOURCADE, S. a E. PEYNAUD. Sur l'action antibacterienne de l'anhydride sulfureux sous forme libre et sous forme combin'ee. *Conn. Vigne Vin*. 1974, č. 8, s. 187-203.
- [94] ROMANO, P. a G. SUZZI. Sulfur dioxide and wine microorganisms. *Wine microbiology and biotechnology*. Philadelphia, Pa.: Harwood Academic Publishers, 1993, s. 373-393.
- [95] MICHLOVSKÝ, M. *Příprava bílých vín*. Vyd. 1. Rakvice: Vinselekt Michlovský, 2014, 289 s. ISBN 978-80-905319-4-9.
- [96] FLEET, G. H. a G. M. HEARD. Yeast-growth during fermentation. *Wine microbiology and biotechnology*. Philadelphia, Pa.: Harwood Academic Publishers, c1993, s. 27-54.
- [97] DELFINI, C., M. CERSOSIMO, V. DEL PRETE, M. STRANO, G. GAETANO, A. PAGLIARA a S. AMBRÒ. Resistance Screening Essay of Wine Lactic Acid Bacteria on Lysozyme: Efficacy of Lysozyme in Unclarified Grape Musts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, vol. 52, issue 7, s. 1861-1866. DOI: 10.1021/jf034824m.

- [98] BAUZA, T., A. BLAISE, J. P. MESTRES, P. L. TEISSEDRE, F. DAUMAS a J. C. CABANIS. Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wines. *Sci Aliment.* 1995, č. 15, s. 367-380.
- [99] Nařízení Komise (ES) č. 606/2009 ze dne 10. července 2009, kterým se stanoví některá prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 479/2008, pokud jde o druhy výrobků z révy vinné, enologické postupy a omezení, která se na ně použijí. In: *Úřední věstník Evropské unie.* 2009.
- [100] LONVAUD-FUNEL, A. Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects. *FEMS Microbiology Letters.* 1995, vol. 126, issue 3, s. 209-214. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07420.x.
- [101] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013 ze dne 17. prosince 2013, kterým se stanoví společná organizace trhů se zemědělskými produkty a zrušují nařízení Rady (EHS) č. 922/72, (EHS) č. 234/79, (ES) č. 1037/2001 a (ES) č. 1234/2007. In: *Úřední věstník Evropské unie.* 2013.
- [102] Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 1271/2014 ze dne 28. listopadu 2014, kterým se povoluje zvýšit mezní hodnoty obohacování vína vyrobeného z vinných hroznů některých moštových odrůd sklizených v roce 2014 v některých vinařských oblastech nebo jejich části. In: *Úřední věstník Evropské unie.* 2014.
- [103] MINÁRIK, E. a A. NAVARA. *Chémia a mikrobiológia vína.* 1. vyd. Bratislava: Príroda, 1986, 547 s.
- [104] VOET, D. a J. G. VOETOVÁ. *Biochemie.* 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 1325 s. ISBN 80-856-0544-9.
- [105] KRESGE, N., R. D. SIMONI a R. L. HILL. Otto Fritz Meyerhof and the Elucidation of the Glycolytic Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. Baltimore, etc.: American Society for Biochemistry and Molecular Biology [etc.], 2005, č. 280, s. 124-126 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/280/4/e3.short>
- [106] BARNETT, J. A. a K. D. ENTIAN. A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast.* 2005, vol. 22, issue 11, s. 835-894. DOI: 10.1128/9781555817152.ch9.

- [107] KOUTNÝ, M. *Metabolismus sacharidů, glykolýza, glukoneogeneze: přednáška*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2011.
- [108] KOOLMAN, J. a K.-H. RÖHM. *Color atlas of biochemistry* [online]. 2nd ed., rev. and enl. New York: Thieme, c2005, x, 467 p. [cit. 2015-04-07]. Thieme flexi-book. ISBN 15-889-0247-1. Dostupné z: http://www.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=hjrcWquBnusC&oi=fnd&pg=PA1&dq=color+atlas+of+biochemistry&ots=a-1aO1deBa&sig=nduOqbYpd5zDZ8DjMgi7aWFyo8&redir_esc=y#v=onepage&q=color%20atlas%20of%20biochemistry&f=false
- [109] MORENO-ARRIBAS, M. V., M. C. POLO a F. S. NOLTE. Winemaking Biochemistry and Microbiology: Current Knowledge and Future Trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2005, vol. 45, issue 4, s. 265-286. DOI: 10.1128/9781555816834.ch34.
- [110] PAVLOUŠEK, P. *Výroba vína u malovinářů* [online]. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 96 s. [cit. 2015-04-07]. ISBN 80-247-1247-4. Dostupné z: http://www.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=ZxiA_pkPYFoC&oi=fnd&pg=PA4&dq=V%C3%BDroba+v%C3%ADna+u+malovina%C5%99%C5%AF&ots=ULs2kb3wtR&sig=O6fVyWFBBTCPsGYKnyYkpa1kmX4&redir_esc=y#v=onepage&q=V%C3%BDroba%20v%C3%ADna%20u%20malovina%C5%99%C5%AF&f=false
- [111] GAWEL, R., L. FRANCIS a E. J. WATERS. Statistical Correlations between the In-Mouth Textural Characteristics and the Chemical Composition of Shiraz Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, vol. 55, issue 7, s. 2683-2687. DOI: 10.1021/jf0633950.
- [112] GAWEL, R., S. VAN SLUYTER, E. J. WATERS. The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines: sensory characteristics and sensory analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2007, vol. 13, issue 1, s. 38-45. DOI: 10.1533/9780857095176.2.196.
- [113] DE NADRA, M. C. M., M. E. FARIÁS, M. V. MORENO-ARRIBAS, E. PUEYO a M. C. POLO. Proteolytic activity of *Leuconostoc oenos*: Effect on proteins and

- polypeptides from white wine. *FEMS Microbiology Letters*. 1997, vol. 150, issue 1, s. 135-139. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb10361.x.
- [114] DE NADRA, M. M. A proteolytic effect of *Oenococcus oeni* on the nitrogenous macromolecular fraction of red wine. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 1999, vol. 174, issue 1, s. 41-47 [cit. 2015-04-07]. DOI: 10.1016/s0378-1097(99)00119-6. Dostupné z: <http://femsle.oxfordjournals.org/content/femsle/174/1/41.full.pdf>
- [115] LEITÃO, M. C., H. C. TEIXEIRA, M. T. B. CRESPO a M. V. S. ROMÃO. Biogenic Amines Occurrence in Wine. Amino Acid Decarboxylase and Proteolytic Activities Expression by *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, vol. 48, issue 7, s. 2780-2784. DOI: 10.1021/jf991135v.
- [116] REMIZE, F., A. GAUDIN, Y. KONG, J. GUZZO, H. ALEXANDRE, S. KRIEGER a M. GUILLOUX-BENATIER. *Oenococcus oeni* preference for peptides: qualitative and quantitative analysis of nitrogen assimilation. *Archives of Microbiology*. 2006, vol. 185, issue 6, s. 459-469. DOI: 10.1007/s00203-006-0116-6.
- [117] ALCAIDE-HIDALGO, J.M., M.V. MORENO-ARRIBAS, M.C. POLO a E. PUEYO. Partial characterization of peptides from red wines. Changes during malolactic fermentation and ageing with lees. *Food Chemistry*. 2008, vol. 107, issue 2, s. 622-630. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.08.054.
- [118] MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J., A. MARCOBAL, C. POLO a M. V. MORENO-ARRIBAS. Technological factors influencing biogenic amine production during red wine manufacture. *European Food Research and Technology*. Berlin: Springer-Verlag, 2006, č. 222, s. 420-424.
- [119] HUBÁČEK, V. a D. MÍŠA. *Vinařův rok*. 1. vyd. Praha: Květ, 1996. ISBN 80-853-6222-8.
- [120] HERNÁNDEZ-ORTE, P., A. C. LAPEÑA, A. PEÑA-GALLEGO, J. ASTRAIN, C. BARON, I. PARDO, L. POLO, S. FERRER, J. CACHO a V. FERREIRA. Biogenic amine determination in wine fermented in oak barrels: Factors affecting formation. *Food Research International*. 2008, vol. 41, issue 7, s. 697-706. DOI: 10.1016/j.foodres.2008.05.002.

- [121] LIU, S.-Q. Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. *Journal of Applied Microbiology*. Oxford: Published for the Society for Applied Bacteriology by Blackwell Science, 2002, č. 92, s. 589-601.
- [122] HUSNIK, J. I., H. VOLSCHEK, J. BAUER, D. COLAVIZZA, Z. LUO, H. J. J. VAN VUUREN, B. DIVOL a F. F. BAUER. Metabolic engineering of malolactic wine yeast. *Metabolic Engineering*. 2006, vol. 8, issue 4, s. 315-323. DOI: 10.1533/9781845699987.1.34.
- [123] PRAMATEFTAKI, P. V. METAFA, M. KALLITHRAKA, S. LANARIDIS Evolution of malolactic bacteria and biogenic amines during spontaneous malolactic fermentations in a Greek winery. *Letters in Applied Microbiology*. 2006, vol. 43, issue 2, s. 155-160. DOI: 10.1111/j.1472-765x.2006.01937.x.
- [124] CARRETE, R., M. TERESA VIDAL, A. BORDONS a M. CONSTANTI. Inhibitory effect of sulfur dioxide and other compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS microbiology letters*. Amsterdam: Published by Elsevier/North Holland on behalf of the Federation of European Microbiological Societies, 2002, č. 211, s. 155-159.
- [125] ROSSMANN, M. *Víno*. 1. vyd. Praha: Vydavatelství obchodu, 1962.
- [126] DAWIS, C. R., D. J. WIBOWO, T. H. LEE a G. H. FLEET. Growth and Metabolism of Lactic Acid Bacteria during and after MLF of Wines at Different pH. *Applied Environmental Microbiology*. 1986, č. 51, s. 539-545.
- [127] WIBOWO, D., R. ESCHENBRUCH, C. R. DAVIS, G. H. FLEET a T. H. LEE. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1985, č. 4, s. 302-313.
- [128] VAN SCHOTHORST, M. *Micro-organisms on foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities*. London: Kluwer Academic, 2005. ISBN 0-306-48676-8.
- [129] ROTTER, B. Malolactic Fermentation. *Improved Winemaking: Advanced Theory, Practical Solutions and Opinion* [online]. 2008 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: <http://www.brsquared.org/wine/Articles/MLF/MLF.htm>
- [130] LIŠKOVÁ, S. *Výskyt bakterií mléčného kvašení ve víně*. Zlín, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.

- [131] Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 2005.
- [132] MORENO-ARRIBAS, M. V., M. C. POLO, F. JORGANES a R. MUÑOZ. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, vol. 84, issue 1, s. 117-123. DOI: 10.1016/s0168-1605(02)00391-4.
- [133] RENOUF, V. a P. LUCAS. Biogenic amines: Avoid spontaneous ML. *Laffort: I'cenologie par nature*. 2010.
- [134] MORENO-ARRIBAS, M. V. a M. C. POLO. Occurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines in biologically aged wines. *Food Microbiology*. 2008, vol. 25, issue 7, s. 875-881. DOI: 10.1016/j.fm.2008.05.004.
- [135] REGUANT, C., A. BORDONS, L. AROLA a N. ROZES. Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine. *Journal of Applied Microbiology*. 2000, vol. 88, issue 6, s. 1065-1071. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01075.x.
- [136] VIVAS, N., A. LONVAUD-FUNEL a Y. GLORIES. Effect of phenolic acids and anthocyanins on growth, viability and malolactic activity of a lactic acid bacterium. *Food Microbiology*. 1997, vol. 14, issue 3, s. 291-299. DOI: 10.1006/fmic.1996.0086.
- [137] ALBERTO, M. R., M. E. FARIÁS a M. C. M. DE NADRA. Effect of Gallic Acid and Catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w Growth and Metabolism of Organic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, vol. 49, issue 9, s. 4359-4363. DOI: 10.1021/jf0101915.
- [138] CAMPOS, F. M., J. A. COUTO a T. A. HOGG. Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Journal of Applied Microbiology*. Oxford: Published for the Society for Applied Bacteriology by Blackwell Science, 2003, č. 94, s. 167-174.
- [139] SALIH, A. G., J. M. LE QUÉRÉ a J. F. DRILLEAU. Action des acides hydroxycinnamiques libres et estérifiés sur la croissance des bactéries lactiques. *Sciences des Aliments*. 2000, vol. 20, issue 6, s. 537-560. DOI: 10.3166/sda.20.537-560.

- [140] MÍŠA, D. Čištění vína. *Wine.cz* [online]. 1998-2015 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: <http://wine.cz/reva/vo5.htm>
- [141] GARCÍA-RUIZ, A., B. BARTOLOMÉ a M. V. MORENO-ARRIBAS. Understanding the effect of oak wood treatments and enological tannins in biogenic amine production by lactic acid bacteria in wines. *World Congress of Vine and Wine, Verone*. 2008.
- [142] MARCO, A. G. a C. A. AZPILICUETA. Amine concentrations in wine stored in bottles at different temperatures. *Food Chemistry*. 2006, vol. 99, issue 4, s. 680-685. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.08.043.
- [143] MORENO, N. J., D. T. GOÑI a C. A. AZPILICUETA. Changes in Amine Concentrations during Aging of Red Wine in Oak Barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, vol. 51, issue 19, s. 5732-5737. DOI: 10.1021/jf030254e.
- [144] FUGELSANG, K. C. a Ch. G. EDWARDS. *Wine microbiology: Practical applications and procedurs* [online]. 2007 [cit. 2015-04-07]. ISBN 978-0-387-33341-0. Dostupné z: http://www.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=sLAszaQ4yV0C&oi=fnd&pg=PR15&dq=Wine+microbiology:+Practical+applications+and+procedurs&ots=BvDPoMgS2T&sig=INVZnIS-unOT6DA9QtoWj2mCgf4&redir_esc=y#v=onepage&q=Wine%20microbiology%3A%20Practical%20applications%20and%20procedurs&f=false
- [145] KONEČNÁ, V. *Srovnání obsahu vybraných dusíkatých látek v červených vínech a klaretech*. Zlín, 2013. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [146] RENOUF, V., O. CLAISSE a A. LONVAUD-FUNEL. Numeration, identification and understanding of microbial biofilm on grape berry surface. *Aust J Grape Wine Res*. 2005, č. 11, s. 316-327.
- [147] BARATA, A., M. MALFEITO-FERREIRA a V. LOUREIRO. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*. 2012, č. 153, s. 243-259.
- [148] GREIF, G., M. GREIFOVÁ a J. KAROVIČOVÁ. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp.

- bacteria in model condition. *Journal of Food and Nutrition Research* [online]. Bratislava: VÚP Food Research Institute, 2006, č. 45 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: <http://www.vup.sk/en/download.php?start&language=en&bulID=4>
- [149] Biogenní aminy v mléčných výrobcích Biogenní aminy v mléčných výrobcích. *Gate2Biotech* [online]. 2006 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/biogenni-aminy-v-mlecnych-vyrobcich/>
- [150] KAROVICOVA, J. a Z. KOHAJDOVA. Biogenic Amines in Food. *ChemInform* [online]. 2003, vol. 36, issue 34, s. 321-361 [cit. 2015-04-07]. DOI: 10.1002/9780470430101.ch3b. Dostupné z: http://www.chempap.org/file_access.php?file=591a70.pdf
- [151] GÖRNER, F. a L. VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967-0649-7.
- [152] BAUER, R. a L. M. T. DICKS. Control of Malolactic Fermentation in Wine: a review. [Http://www.sawislibrary.co.za/](http://www.sawislibrary.co.za/) [online]. 2004 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: <http://www.sawislibrary.co.za/dbtextimages/bauerr1.pdf>
- [153] FERNÁNDEZ, M., D. M. LINARES, A. RODRÍGUEZ a M. A. ALVAREZ. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus furans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology*. New York: Springer International, 2007, roč. 73, č. 6, s. 1400-1406.
- [154] OSBORNE, J. P. a Ch. G. EDWARDS. Bacteria important during winemaking. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2005, č. 50, s. 137-177.
- [155] FARKAŠ, J. *Technology and biochemistry of wine* [online]. 2. vyd. London: Gordon and Breach Science Publishers, 1988 [cit. 2015-04-07]. ISBN 2-88124-069-0. Dostupné z: http://www.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=mjif7IXzrVMC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Technology+and+biochemistry+of+wine&ots=-SOORKM86Q&sig=wIQbZXylRenFqMQb7WJv95tXr6c&redir_esc=y#v=onepage&q=Technology%20and%20biochemistry%20of%20wine&f=false

- [156] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, E. POLLAKOVÁ, T. PODEŠVOVÁ, V. DRÁB, P. The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, č. 2, s. 112-119. DOI: 10.1007/978-1-4615-2668-1_8.
- [157] SHALABY, A. R., KIM, S. BOVER-CID a VECIANA-NOGUÉS. Significance of biogenic amines to food safety and human health: Biogenic Amines. *Food Research International*. 1996, č. 29, s. 675-690. DOI: 10.1016/b978-0-12-378612-8.00216-x.
- [158] LONVAUD-FUNEL, A. a A. JOYEUX. Histamine Production by Wine Lactic Acid Bacteria: Isolation of a Histamine producing Strain of *Leuconostoc oenos*. *The Journal of Applied Bacteriology*. New York: Blackwell Scientific, 1994, č. 77, s. 401-407.
- [159] LANDETE, J. M., S. FERRER a I. PARDO. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control*. 2007, 103 (4), s. 1475-1486.
- [160] FARIAS, M. E., M. C. M. DE NADRA, G. C. ROLLAN a A. M. STRASSER DE SAAD. Histidine decarboxylase activity in lactic acid bacteria from wine. *Journal Int. Sci. Vigne Vin*. 1993, č. 27, s. 191-199.
- [161] CROW, V., B. CURRY a M. HAYES. The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their uses as adjuncts in New Zeland Cheddar. *International Dairy Journal*. 2001, č. 11, s. 275-283.
- [162] MORENO-ARRIBAS, V. a A. LONVAUD-FUNEL. Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367. *FEMS microbiology letters* [online]. Amsterdam: Published by Elsevier/North Holland on behalf of the Federation of European Microbiological Societies, 1999, č. 180, s. 55-60 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: <http://femsle.oxfordjournals.org/content/femsle/180/1/55.full.pdf>
- [163] TORREA, D. a C. ANCÍN. Content of Biogenic Amines in a Chardonnay Wine Obtained through Spontaneous and Inoculated Fermentations. *Journal of Agricul-*

- tural and Food Chemistry*. 2002, vol. 50, issue 17, s. 4895-4899. DOI: 10.1021/jf011653h.
- [164] GRANCHI, L., P. ROMANO, S. MANGANI, S. GUERRINI a M. VINCENZINI. Production of biogenic amines by wine microorganisms. *Le Bulletin de L'OIV* [online]. 2005, č. 78, s. 595-609 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: http://www.oiv.int/oiv/files/Bull_OIV_2005_sept_oct.pdf#page=17
- [165] SASS-KISS, A., E. SZERDAHELYI a G. HAJÓS. Study of biologically active amines in grapes and wines by HPLC. *Chromatographia*. 2000, vol. 51, issue 1, S316-S320. DOI: 10.1007/bf02492826.
- [166] Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 203/2012 ze dne 8. března 2012, kterým se mění nařízení (ES) č. 889/2008, kterým se stanoví prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 834/2007, pokud jde o prováděcí pravidla pro ekologickou produkci vína. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 2012.
- [167] ČERNÍKOVÁ, M. a Z. MÍŠKOVÁ. *Praktická cvičení z potravinářské mikrobiologie*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010, 134 s. ISBN 978-80-7318-749-1.
- [168] Acetobacter Agar (Glucose): Technical Data. *HIMedia Labs* [online]. 2011 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: <http://himedialabs.com/TD/M238.pdf>
- [169] Acetobacter Agar (Mannitol): Technical Data. *Ridacom.com* [online]. 2011 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCAQ-FjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ridacom.com%2Fproducts%2Fdl%2F644&ei=WaAjVbTWBsOPPY-6gZAF&usg=AFQjCNHApgg8xGD8NNPJXBAAXS0PsgKeSw&sig2=AzKqHDi6j3RT3s9EH_nFiQ&bvm=bv.89947451,d.ZWU&cad=rja
- [170] M.R.S Agar - de Man, Rogosa and Sharpe Agar. *Labm.com* [online]. [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: <http://www.labm.com/products/m-r-s-agar-de-man-rogosa-and-sharpe-agar.asp>

- [171] Tomato Juice Agar (7349). *Neogen.com* [online]. 2011 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7349_PI.pdf
- [172] MORET, S., D. SMELA, T. POPULIN a L. S. CONTE. A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. *Food Chemistry*. 2005, vol. 89, issue 3, s. 355-361. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.02.050.
- [173] GROS, C. a B. LABOUESSE. Study of the dansylation reaction of amino acids, peptides and proteins. *European J. Biochem.* [online]. 1968, č. 7, s. 463-470 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1969.tb19632.x/pdf>
- [174] DADÁKOVÁ, E., KŘÍŽEK a T. PELIKÁNOVÁ. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. 2009, č. 116, s. 365-370.
- [175] ČSN 56 9609. *Pravidla správné hygienické a výrobní praxe: Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace*. Praha: Český normalizační institut, 2008.
- [176] BARATA, A., M. MALFEITO-FERREIRA a V. LOUREIRO. Changes in sour rotten grape berry microbiota during ripening and wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2012, č. 154, s. 152-161.
- [177] BARBE, J.-C., G. DE REVEL, A. JOYEUX, A. BERTRAND a A. LONVAUD-FUNEL. Role of botrytized grape micro-organisms in SO₂ binding phenomena. *Journal of Applied Microbiology*. 2001, vol. 90, issue 1, s. 34-42. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01200.x.
- [178] FLEET, G., PRAKITCHAIWATTANA, A. BEH a G. HEARD. *Biodiversity and biotechnology of wine yeasts*. Trivandrum: Research Signpost, 2002. ISBN 81-773-6120-1.
- [179] BARATA, A., S. GONZÁLEZ, M. MALFEITO-FERREIRA, A. QUEROL, V. LOUREIRO a HELLIN. Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts. *FEMS Yeast Research*. 2008, vol. 8, issue 7, s. 1008-1017. DOI: 10.1007/978-0-387-33349-6_11.

- [180] FRANCESCA, N., L. SETTANNI, C. SANNINO, M. APONTE a G. MOSCHETTI. Ecology and technological capability of lactic acid bacteria isolated during Grillo grape vinification in the Marsala production area. *Annals of Microbiology*. 2010, vol. 61, issue 1, s. 79-84. DOI: 10.1007/s13213-010-0109-1.
- [181] HEARD, G. M. a G. H. FLEET. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology*. 1988, vol. 65, issue 1, s. 23-28. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1988.tb04312.x.
- [182] ROP, O. a J. HRABĚ. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009, 129 s. ISBN 978-80-7318-748-4.
- [183] ČSN 56 0084. *Stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů kultivací v tekutých půdách (potravinářské výrobky)*. Praha: Český normalizační institut, 1970.
- [184] ČSN 56 0094. *Stanovení počtu bakterií rodu Lactobacillus (potravinářské výrobky)*. Praha: Český normalizační institut, 1989.
- [185] ČSN ISO 21527-1. *Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní: Část 1: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody vyšší než 0,95*. Praha: Český normalizační institut, 2009.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AAG	Acetobacter Agar Glucose
AAM	Acetobacter Agar Mannitol
BA	biogenní amin
DAO	diamin oxidáza (EC.1.4.3.6)
HDC	histidin dekarboxyláza (EC.4.1.1.22)
HMT	metyltransferáza (EC.1.1.2.85)
CHYGA	Chloramfenikol Yeast Glucose Agar
MAO	monoamin oxidáza (EC.1.4.3.4)
MRS	de Man, Rogosa and Sharpe agar
N	nepočítatelně mnoho kolonií
ND	nepřítomnost mikroorganismu na půdě (z angl. „not detected“)
PCA	Plate Count Agar
RM	rulandské modré
RR	ryzlink rýnský
TDC	tyrozin dekarboxyláza (EC.4.1.1.25)
TJA	Tomato Juice Agar
VZ	veltlínské zelené

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 - Vybrané biogenní aminy a jejich prekurzory (aminokyseliny) [12].....	13
Obr. 2 - Vzájemné vztahy tvorby biogenních aminů [15]	14
Obr. 3 - Schéma glykolýzy [107,108]	24
Obr. 4 - Přeměna L-jablečné kyseliny na L-mléčnou kyselinu [77,78]	27
Obr. 5 - Schéma derivatizace aminů na příslušné dansylchloridy [173].....	43
Obr. 6 - Obsah biogenních aminů z různých odběrových míst - veltlínské zelené 2013.....	57
Obr. 7 - Obsah jednotlivých detekovaných biogenních aminů - veltlínské zelené 2013	58
Obr. 8 - Obsah biogenních aminů z různých odběrových míst - veltlínské zelené 2014.....	59
Obr. 9 - Obsah biogenních aminů z různých odběrových míst - ryzlink rýnský 2013.....	61
Obr. 10 - Obsah jednotlivých detekovaných biogenních aminů - ryzlink rýnský 2013	62
Obr. 11 - Obsah biogenních aminů z různých odběrových míst - rulandské modré 2013	64
Obr. 12 - Obsah jednotlivých detekovaných biogenních aminů - rulandské modré 2013	65
Obr. 13 - Obsah biogenních aminů z různých odběrových míst - rulandské modré 2014.....	66
Obr. 14 - Porovnání obsahů biogenních aminů mezi odrůdami - 2013	67
Obr. 15 - Obsah jednotlivých detekovaných biogenních aminů v komerčních vínech 2013	68
Obr. 16 - Porovnání obsahu biogenních aminů mezi víny zařazenými do sledování v průběhu výroby a komerčními víny 2013	69

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 - Faktory ovlivňující syntézu biogenních aminů	16
Tab. 2 - Vybrané biogenní aminy a jejich účinky [1,6,15,50,51,52,58,59,60,61]	18
Tab. 3 - Schéma odběrů vzorků	37
Tab. 4 - Povolená množství SO ₂ v ekologických vínech [166]	38
Tab. 5 - Metody inokulace u jednotlivých odrůd a fází odběrů - 2013.....	40
Tab. 6 - Postup derivatizace [174]	44
Tab. 7 - Výsledky mikrobiologického rozboru - veltlínské zelené 2013 [KTJ/g]	47
Tab. 8 - Výsledky mikrobiologického rozboru - veltlínské zelené 2014 [KTJ/g]	49
Tab. 9 - Výsledky mikrobiologického rozboru - ryzlink rýnský 2013 [KTJ/g]	50
Tab. 10 - Výsledky mikrobiologického rozboru - ryzlink rýnský 2014 [KTJ/g]	52
Tab. 11 - Výsledky mikrobiologického rozboru - rulandské modré 2013 [KTJ/g]	53
Tab. 12 - Výsledky mikrobiologického rozboru - rulandské modré 2014 [KTJ/g]	54
Tab. 13 - Výsledky mikrobiologického rozboru komerčních vín [KTJ/g]	54
Tab. 14 - Obsah jednotlivých detekovaných biogenních aminů - veltlínské zelené 2014 [mg/l]	60
Tab. 15 - Obsah biogenních aminů z různých odběrových míst - ryzlink rýnský 2014 [mg/l]	63
Tab. 16 - Obsah jednotlivých detekovaných biogenních aminů - ryzlink rýnský 2014 [mg/l]	63
Tab. 17 - Obsah jednotlivých detekovaných biogenních aminů - rulandské modré 2014 [mg/l]	66
Tab. 18 - Porovnání obsahu biogenních aminů mezi odrůdami - 2014 [mg/l]	68

SEZNAM PŘÍLOH

- PŘÍLOHA P I:** VÝSLEDKY ANALÝZY OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ VE VELTLÍNSKÉM ZELENÉM 2013
- PŘÍLOHA P II:** VÝSLEDKY ANALÝZY OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ VE VELTLÍNSKÉM ZELENÉM 2014
- PŘÍLOHA P III:** VÝSLEDKY ANALÝZY OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V RYZLINKU RÝNSKÉM 2013
- PŘÍLOHA P IV:** VÝSLEDKY ANALÝZY OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V RYZLINKU RÝNSKÉM 2014
- PŘÍLOHA P V:** VÝSLEDKY ANALÝZY OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V RULANDSKÉM MODRÉM 2013
- PŘÍLOHA P VI:** VÝSLEDKY ANALÝZY OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V RULANDSKÉM MODRÉM 2014
- PŘÍLOHA P VII:** VÝSLEDKY ANALÝZY OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V KOMERČNÍCH VÍNECH 2013
- PŘÍLOHA** CD obsahující přiloženou diplomovou práci ve formátu PDF, a jednotlivé přílohy

PŘÍLOHA PI: VÝSLEDKY ANALÝZY OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ VE VELTLÍNSKÉM ZELENÉM 2013

MOŠT		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	ND	
PUT	ND	
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	ND	
SPD	1,1	0,1
SPM	1,1	0,1
Suma	2,2	

21 DNÍ PO STÁČENÍ		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	ND	
PUT	ND	
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	3,3	0,2
SPD	2,5	0,2
SPM	2,3	0,4
Suma	8,1	

60 DNÍ PO STÁČENÍ		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	ND	
PUT	ND	
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	6,4	0,2
SPD	2,3	0,2
SPM	2,8	0,4
Suma	11,4	

90 DNÍ PO STÁČENÍ		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	1,8	0,2
PUT	ND	
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	22,3	0,3
SPD	2,1	0,1
SPM	2,8	0,1
Suma	28,9	

průměr...průměrná hodnota ze všech stanovení i odběrových míst [mg/l]

SD...směrodatná odchylka: udává, jak moc se lišily stejné vzorky (od každého vzorku byla provedena 4 stanovení)

ND...nebylo detekováno (nebylo stanoveno) nebo bylo stanoveno pod mezí detekce přístroje

TRYP = tryptamin, PEA = fenyletylamin, PUT = putrescin, CAD = kadaverin, HIM = histamin, TYM = tyramin, SPD = spermidin, SPM = spermin

**PŘÍLOHA P II: VÝSLEDKY ANALÝZY OBSAHU BIOGENNÍCH
AMINŮ VE VELTLÍNSKÉM ZELENÉM 2014**

BOBULE		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	ND	
PUT	ND	
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	ND	
SPD	1,7	0,2
SPM	10,6	0,7
Suma	12,3	

MLADÉ VÍNO		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	ND	
PUT	2,4	0,6
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	3,1	1,7
SPD	0,4	0,0
SPM	3,3	0,3
Suma	9,1	

průměr...průměrná hodnota ze všech stanovení i odběrových míst [mg/l]

SD...směrodatná odchylka: udává, jak moc se lišily stejné vzorky (od každého vzorku byla provedena 4 stanovení)

ND...nebylo detekováno (nebylo stanoveno) nebo bylo stanoveno pod mezí detekce přístroje

TRYP = tryptamin, PEA = fenyletylamin, PUT = putrescin, CAD = kadaverin, HIM = histamin, TYM = tyramin, SPD = spermidin, SPM = spermin

PŘÍLOHA P III: VÝSLEDKY ANALÝZY OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V RYZLINKU RÝNSKÉM 2013

MOŠT		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	ND	
PUT	ND	
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	ND	
SPD	1,3	0,1
SPM	0,8	0,0
Suma	2,1	

MLADÉ VÍNO		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	ND	
PUT	ND	
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	2,5	0,2
SPD	2,3	0,2
SPM	2,6	0,3
Suma	7,4	

21 DNÍ PO STÁČENÍ		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	ND	
PUT	ND	
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	5,9	0,6
SPD	1,6	0,1
SPM	1,8	0,1
Suma	9,3	

60 DNÍ PO STÁČENÍ		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	ND	
PUT	ND	
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	15,8	1,3
SPD	2,5	0,5
SPM	2,1	0,1
Suma	20,4	

90 DNÍ PO STÁČENÍ		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	1,8	0,2
PUT	ND	
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	37,8	3,6
SPD	2,3	0,3
SPM	2,0	0,3
Suma	44,0	

průměr...průměrná hodnota ze všech stanovení i odběrových míst [mg/l]

SD...směrodatná odchylka: udává, jak moc se lišily stejné vzorky (od každého vzorku byla provedena 4 stanovení)

ND...nebylo detekováno (nebylo stanoveno) nebo bylo stanoveno pod mezí detekce přístroje

TRYP = tryptamin, PEA = fenyletylamin, PUT = putrescin, CAD = kadaverin, HIM = histamin, TYM = tyramin, SPD = spermidin, SPM = spermin

PŘÍLOHA P IV: VÝSLEDKY ANALÝZY OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V RYZLINKU RÝNSKÉM 2014

BOBULE		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	ND	
PUT	ND	
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	ND	
SPD	1,5	0,4
SPM	9,6	0,8
Suma	11,1	

průměr...průměrná hodnota ze všech stanovení i odběrových míst [mg/l]

SD...směrodatná odchylka: udává, jak moc se lišily stejné vzorky (od každého vzorku byla provedena 4 stanovení)

ND...nebylo detekováno (nebylo stanoveno) nebo bylo stanoveno pod mezí detekce přístroje

TRYP = tryptamin, PEA = fenyletylamin, PUT = putrescin, CAD = kadaverin, HIM = histamin, TYM = tyramin, SPD = spermidin, SPM = spermin

**PŘÍLOHA P V: VÝSLEDKY ANALÝZY OBSAHU BIOGENNÍCH
AMINŮ V RULANDSKÉM MODRÉM 2013**

RMUT		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	ND	
PUT	ND	
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	1,7	0,2
SPD	1,9	0,1
SPM	1,4	0,3
Suma	4,9	

MOŠT		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	ND	
PUT	ND	
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	4,6	0,2
SPD	1,1	0,1
SPM	1,2	0,1
Suma	6,8	

21 DNÍ PO STÁČENÍ		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	ND	
PUT	ND	
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	14,3	1,4
SPD	1,4	0,4
SPM	1,0	0,1
Suma	16,7	

60 DNÍ PO STÁČENÍ		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	ND	
PUT	ND	
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	31,1	2,3
SPD	1,4	0,3
SPM	1,5	0,3
Suma	34,0	

90 DNÍ PO STÁČENÍ		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	ND	
PUT	ND	
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	43,4	1,6
SPD	1,1	0,2
SPM	1,8	0,2
Suma	46,3	

průměr...průměrná hodnota ze všech stanovení i odběrových míst [mg/l]

SD...směrodatná odchylka: udává, jak moc se lišily stejné vzorky (od každého vzorku byla provedena 4 stanovení)

ND...nebylo detekováno (nebylo stanoveno) nebo bylo stanoveno pod mezí detekce přístroje

TRYP = tryptamin, PEA = fenyletylamin, PUT = putrescin, CAD = kadaverin, HIM = histamin, TYM = tyramin, SPD = spermidin, SPM = spermin

**PŘÍLOHA P VI: VÝSLEDKY ANALÝZY OBSAHU BIOGENNÍCH
AMINŮ V RULANDSKÉM MODRÉM 2014**

BOBULE		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	ND	
PUT	ND	
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	ND	
SPD	2,0	0,2
SPM	10,8	0,9
Suma	12,8	

MLADÉ VÍNO		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	ND	
PUT	2,1	0,3
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	5,8	7,2
SPD	0,6	0,1
SPM	3,7	0,2
Suma	12,2	

průměr...průměrná hodnota ze všech stanovení i odběrových míst [mg/l]

SD...směrodatná odchylka: udává, jak moc se lišily stejné vzorky (od každého vzorku byla provedena 4 stanovení)

ND...nebylo detekováno (nebylo stanoveno) nebo bylo stanoveno pod mezí detekce přístroje

TRYP = tryptamin, PEA = fenyletylamin, PUT = putrescin, CAD = kadaverin, HIM = histamin, TYM = tyramin, SPD = spermidin, SPM = spermin

**PŘÍLOHA P VII: VÝSLEDKY ANALÝZY OBSAHU BIOGENNÍCH
AMINŮ V KOMERČNÍCH VÍNECH 2013**

VELTLÍNSKÉ ZELENÉ		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	ND	
PUT	1,9	0,0
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	5,7	0,1
SPD	0,2	0,0
SPM	7,4	0,3
Suma	15,1	

RYZLINK RÝNSKÝ		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	ND	
PUT	3,1	0,2
CAD	ND	
HIM	ND	
TYM	2,6	0,1
SPD	0,4	0,0
SPM	8,9	0,5
Suma	15,0	

RULANDSKÉ MODRÉ		
	průměr	SD
TRYP	ND	
PEA	ND	
PUT	39,6	2,6
CAD	ND	
HIM	18,8	1,0
TYM	12,4	0,5
SPD	2,2	0,1
SPM	4,3	0,2
Suma	77,3	

průměr...průměrná hodnota ze všech stanovení i odběrových míst [mg/l]

SD...směrodatná odchylka: udává, jak moc se lišily stejné vzorky (od každého vzorku byla provedena 4 stanovení)

ND...nebylo detekováno (nebylo stanoveno) nebo bylo stanoveno pod mezí detekce přístroje

TRYP = tryptamin, PEA = fenyletylamin, PUT = putrescin, CAD = kadaverin, HIM = histamin, TYM = tyramin, SPD = spermidin, SPM = spermin

