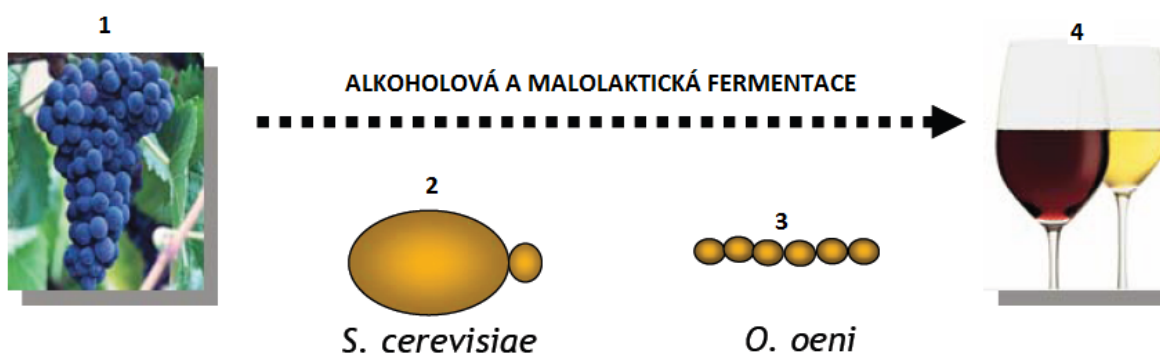


BIOLOGICKÉ ODBOURÁNÍ KYSELIN

Baroň M.

Biologické odbourání kyselin, jablečno-mléčná či malolaktická (od malic acid = kyselina jablečná, lactic acid = kyselina mléčná) fermentace je proces, při němž dochází ke konverzi v chuti drsné kyseliny jablečné, přirozeně vyskytující se v hroznech, na jemnější kyselinu mléčnou. Biologické odbourání kyselin ústí v produkci kulatějších a plnějších vín. Dalším nesporným kladem odbouraných vín je vyšší stabilita a nižší potřeba oxidu siřičitého. Mnozí vinaři také sdílí pocit, že pro přirozenější souhru ovocnosti a dubového charakteru lze dosáhnout, pokud je odbourání provedeno v sudu (barrique). Jak správně odbourání provést, jaký typ vína se pro něj nehodí a na co je třeba dát si pozor, jsou stále velmi aktuální témata.



Bakterie mléčného kvašení jsou gram pozitivní organismy. Nacházejí se přirozeně v přírodě a jsou pro člověka důležité při výrobě mnoha fermentovaných potravin a nápojů. Nejužívanější bakterií ve vinařství je *Oenococcus oeni*. Biologické odbourání kyselin (BOK) se odkazuje na přeměnu malátu na laktát (viz schéma 1), což vede k výrobě energie ve formě ATP. Malát je anion dikarboxylové kyseliny, což znamená, že obsahuje dvě kyselé, karboxylové skupiny. Oproti tomu laktát obsahuje pouze jednu. Proto je konverze malátu na laktát doprovázena vznikem jedné molekuly CO_2 a snížením kyselosti prostředí. Během BOK dochází často i k odbourání kyseliny citrónové.

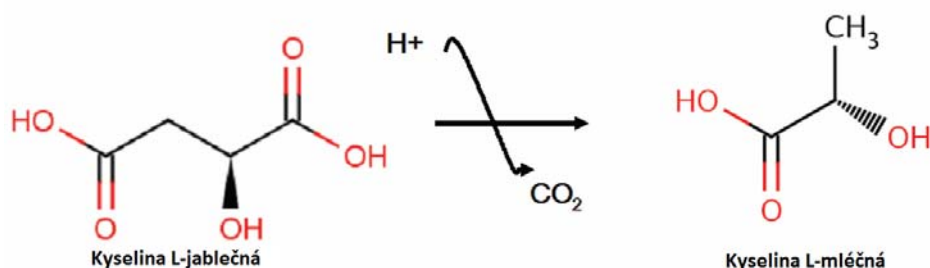


Schéma 1: Chemismus BOK.

BOK má značný vliv na chuť a aroma vína a zařazení tohoto kroku do technologie vína je stěžejní pro filozofii jeho výroby.

DOPADY BOK NA VÍNO:

I. ODKYSELENÍ

Odkyselení nemusí být žádoucí u vín s již nízkou kyselostí. Tato konverze však může snadno nastat spontánně a výsledná vína často vykazují nízkou kvalitu.

- Snížení množství titrovatelných kyselin
- Zvýšení pH o 0,1 až 0,3 jednotek
- Důležité pro vysoce kyselá vína
- Může být nežádoucí při vysokém pH vína

U vín s vysokým pH (nad 3,5), metabolická aktivita bakterií mléčného kvašení může zvýšit pH na úroveň, která podporuje růst více druhů mikroorganismů způsobujících nečistý průběh BOK.

II. BAKTERIÁLNÍ STABILITA

BOK je bezesporu důležitý krok pro zvýšení bakteriální stability budoucího vína potlačením růstu jiných bakterií. To je způsobeno spotřebou veškerých živin v médiu. Podmínky tak již nejsou tolerantní pro jiné mikroorganismy. To může mít také za důsledek produkci bakteriocinů, sloučenin toxických pro členy jiných druhů a tím vysoce nehostinné podmínky pro ostatní mikroby.

- Konzumace živin, které nejsou nadále k dispozici pro jiné organismy
- Produkce toxinů (bakteriocinů), které mohou inhibovat růst ostatních bakterií
- Zabránění BOK v láhvi

Dalším důležitým dopadem BOK je inhibice růstu bakterií v láhvi. Tento jev je vítaný především v případě výroby sektů metodou kvašení v láhvi. Existuje několik důvodů, proč je růst bakterií v láhvi nežádoucí.

BOK v láhvi:

- Zvýšení zákalu vlivem růstu buněk
- Produkce CO₂
- Produkce polysacharidů - vznik opalescence a zvýšení viskozity
- Zvýšení pH, růst nežádoucích mikroorganismů
- Neumožňuje kontrolu vznikajícího vína

V tomto případě je stěžejní především kontrola nad BOK. Pokud vzniká během BOK problém, může vinař nepatrně zvýšit množství SO₂ nebo snížit pH, pokud je vysoké.

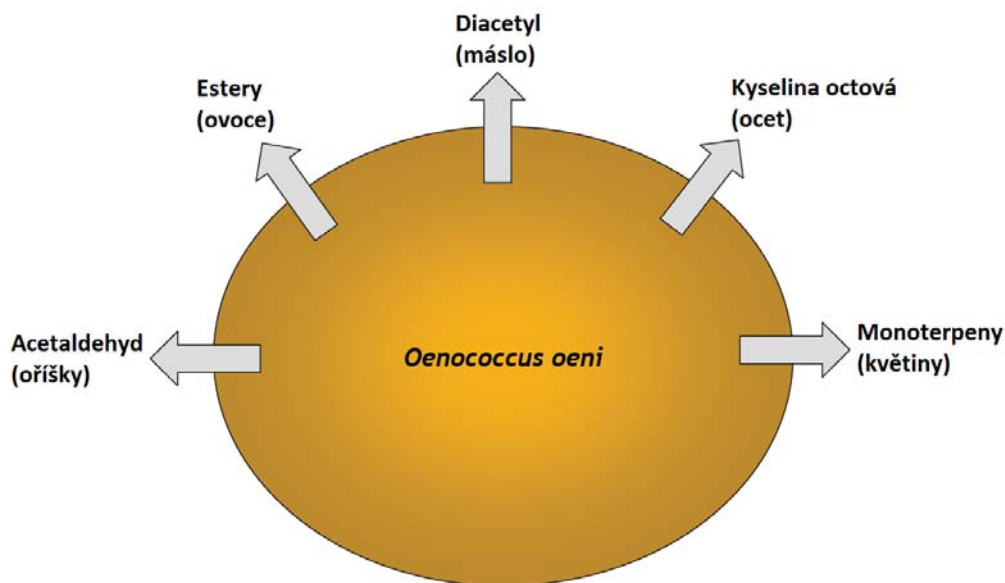
Což může být dostatečně selektivní pro "špatné" mléčné bakterie. Nic z toho není možné, pokud je víno již v láhvi.

III. ZMĚNA V CHARAKTERU A AROMA VÍNA

Během BOK dochází k několika veledůležitým změnám, které se projeví ve výsledné chuti a aroma vína. Krom odkyselení může vznikat také nežádoucí kyselina octová.

Látky spojené s BOK (také viz obr. 1):

- Kyselina octová
- Diacetyl
- Acetoin
- 2,3 – butantediol
- Etyllaktát
- Dietyl sukcinát
- Monoterpeny
- Ostatní sloučeniny



Obr. 1: Produkce hlavních skupin látek během BOK.

Kyselina octová je zodpovědná za 90 % těkavých kyselin vína. Během BOK vzniká především z metabolismu cukrů a odbourávání kyseliny citrónové. Vyprodukované množství kyseliny octové může být významné také při vysokém dávkování kyslíku (přílišné provzdušnění či oxidační podmínky). Za běžných podmínek a úspěšně provedené BOK jsou za většinu těkavých kyselin ve víně (0,2 – 0,5 g/L) zodpovědné kvasinky a alkoholová fermentace. Stejná je i situace s etylacetátem (odlakovač). Bakterie vytvoří běžně jen 0,1 – 0,3 g/L těkavých kyselin v případě odbourávání kyseliny citrónové.

Avšak v případě metabolismu cukrů jsou schopny vyprodukovat až několik gramů kyseliny octové na litr vína. To vede k plnému znehodnocení vína.

Základní předpoklady pro BOK bez výrazného zvýšení obsahu těkavých kyselin:

- Metabolismus *Oenococcus oeni* v hroznovém moštu případně u vín se zbytkovým cukrem (pH>3,5)

Glukóza/fruktóza	→	kyselina D-mléčná, kys. octová , etanol, CO ₂
Fruktóza	→	manitol
Kyselina L-jablečná	→	kyselina L-mléčná, CO ₂

PŘI NIŽŠÍM PH *OENOCOCCUS OENI* PREFERUJE KYSELINU JABLEČNOU NE CUKRY!

- Metabolismus *Oenococcus oeni* u suchých vín (pH<3,5)

Kyselina L-jablečná	→	kyselina L-mléčná, CO ₂
Kyselina citronová	→	kyselina octová , diacetyl, acetoin, butandiol

Diacetyl je zodpovědný za máslové, mléčné, „popcorn“, jogurt aroma odbouraných vín.

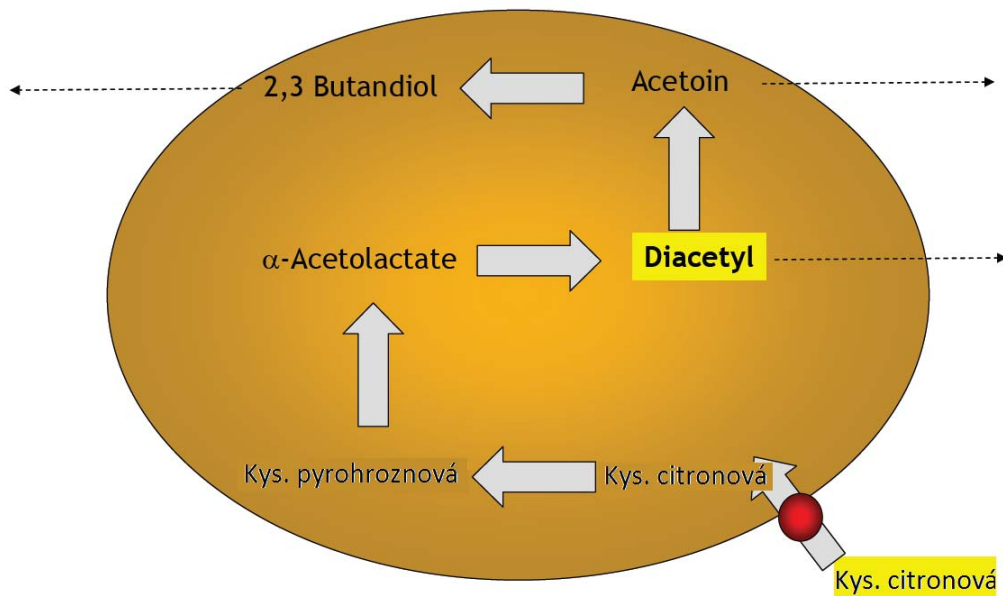
- *Oenococcus oeni* je hlavním producentem tohoto typu aroma (1 – 7 mg/L).
- Jeho obsah je příjemný v nižších koncentracích – hlavně v červených vínech.
- Kvasinky jsou schopny vyprodukovat pouze několik desetin mg/L vína.
- Práh vnímatelnosti je od 0,2 – 3 mg/L
- Od 7mg/L je nežádoucí
- Diacetyl překrývá odrůdové a ovocné charakteristiky
- Při nízkých koncentracích dopomáhá ke komplexitě vína
- Jeho koncentrace je přímoúměrná množství kyseliny citronové

Práh vnímatelnosti diacetylu ve víně se liší odrůdu od odrůdy a je značně individuální. Některé zdroje uvádí práh vnímatelnosti:

- Chardonnay – 0,2 mg/L
- Pinot Noir – 0,9 mg/L
- Cabernet Sauvignon – 2,8 mg/L

Acetoin a butandiol jsou látky odvozené od diacetylu. Acetoin je podobně jako diacetyl ještě dosti sensoricky aktivní a jeho mléčný charakter je taktéž obdobný. Butandiol (finální produkt po redukci diacetylu) je již sensoricky neutrální a jeho výskyt je tudíž preferovaný. Dále se během BOK uvolňuje mnoho pozitivních i negativních látek. Mezi pozitivní jde jistě zařadit květnaté a ovocné esterové vůně.

Mezi negativní rozhodně patří látky odvozené od degradace aminokyselin, jejichž charakter je často přirovnáván až k fekáliím. Z tohoto a mnoha dalších důvodů je výhodné provádět BOK v prostředí mikrooxidace – sudu.



Obr. 2: Vznik diacetylu, acetoinu a butandiolu během BOK.

IV. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ BOK

- pH (2,9 – 3,5)

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících průběh BOK je pH. Hodnota pH média určuje, které mléčné bakterie budou přítomny. Při pH nižším než 2,9 jsou *Oenococcus oeni* inhibovány. Naopak při pH vyšším než 3,5 preferují metabolismus cukrů za vzniku kyseliny octové. Při pH 3,8 například probíhá odbourávání 10x rychleji, ale je přítomno mnoho jiných druhů bakterií s nežádoucím dopadem na kvalitu vína.

- SO₂ (nejlépe žádný volný, do 20 mg/L, vázaný do 50 mg/L)

Dalším faktorem, který je velmi důležitý při řízení BOK je použití SO₂. Bakterie obecně jsou velice citlivé na SO₂, mnohem více, než kvasinky. V této souvislosti je nutné si uvědomit závislost volného SO₂ na pH a produkci SO₂ kvasinkami. Ty jsou schopny produkovat několik desítek miligramů na litr, což může vést k inhibici mléčných bakterií.

- Teplota (18 – 22°C)

Optimální teplota pro mléčné bakterie je 20 – 37°C. Při vyšší teplotě dochází k podstatně rychlejší konverzi, avšak může se jí účastnit mnoho nežádaných druhů. Pod 15°C jsou bakterie inhibovány.

- Alkohol (do 14 % obj.)

Obecně platí, že jsou mléčné bakterie inhibovány nad 14 % obj. alkoholu, podobně jako kvasinky. Některé selektované druhy jsou tolerantnější.

- Výživa (přítomnost jemných kvasničných kalů)

Bakterie mléčného kvašení jsou náročné na mnoho růstových faktorů. Ideálním prostředím zajišťují jemné kvasničné kaly, které svou autolýzou uvolňují všechny potřebné živiny. Mléčné bakterie bohužel, na rozdíl od kvasinek, vyžadují přítomnost několika aminokyselin, což znamená, že nemohou syntetizovat všech 20 aminokyselin z amonných iontů. To je jeden z důvodů, proč je aktivita mléčných bakterií během alkoholové fermentace značně potlačena.

- Kyslík (v malém množství stimuluje růst – výhoda sudů)

Malé množství kyslíku během BOK stimuluje růst populace mléčných bakterií a ovlivňuje spektrum finálních produktů ve prospěch žádaných látek. V případě přehnaného množství kyslíku je však vytvářeno vyšší množství kyseliny octové.

- Fenolické látky (stimulace antokyany a kyselinou galovou)
- Organické kyseliny (inhibice vyššími mastnými kyselinami – vážnoucí fermentace)
- Přítomnost jiných druhů mléčných bakterií (nežádoucí - souboj o živiny, bakteriociny)
- Oxid uhličitý (žádaný - pufruje médium)

V. MANAGMENT BOK

Průběh BOK vyžaduje z hlediska biochemie procesu dostatečné množství NAD^+ a Mn^{2+} . Faktorů ovlivňujících rychlost a průběh BOK je celá řada. Jeden z klíčových faktorů zůstává načasování aplikace bakterií (inokulace) s ohledem na alkoholovou fermentaci. Obecně lze říci, že stěžejní je vzájemné ovlivnění kvasinek a mléčných bakterií. Některé kmeny kvasinek jsou citlivé na přítomnost bakterií a je nutné s inokulací počkat až po úplném doběhu alkoholové fermentace. Jiné kmeny používané v prodáváných setech se s bakteriemi dobře snáší a je možné inokulovat současně. V každém případě je nutné udělat několik zásadních rozhodnutí.

- Chci zařadit BOK?

- Spontánní vs. inokulované BOK, volba správného kmene?
- Volba načasování inokulace?

1. Před-fermentační inokulace

Před-fermentační inokulace bakterií může snížit množství živin pro kvasinky, což vede k produkci nežádoucích látek nebo zastavení následné alkoholové fermentace. Dalším předmětem výzkumu je produkce speciálních látek inhibujících kvasinky.

2. Simultánní inokulace se zákvasem

V poslední době často využívaná a doporučovaná varianta. Je nutná snášenlivost mezi kvasinkami a bakteriemi. Kvasinky vždy převládají a BOK nastává až po exponenciální fázi alkoholové fermentace. Výhoda je využití tepla produkovaného během alkoholové fermentace. Některé zdroje uvádí ovocnější typ odbouraného vína a rychlejší průběh.

3. Inokulace uprostřed fermentace

Opět nutná snášenlivost mezi kvasinkami a bakteriemi. Využití tepla produkovaného během alkoholové fermentace pro namnožení bakterií. Možný problém s výživou.

U VŠECH TŘÍ VARIANT JE NUTNÉ DBÁT NA PH<3,5 Z DŮVODU KONVERZE CUKRŮ NA KYS. OCTOVOU!!!

4. Post-fermentační inokulace

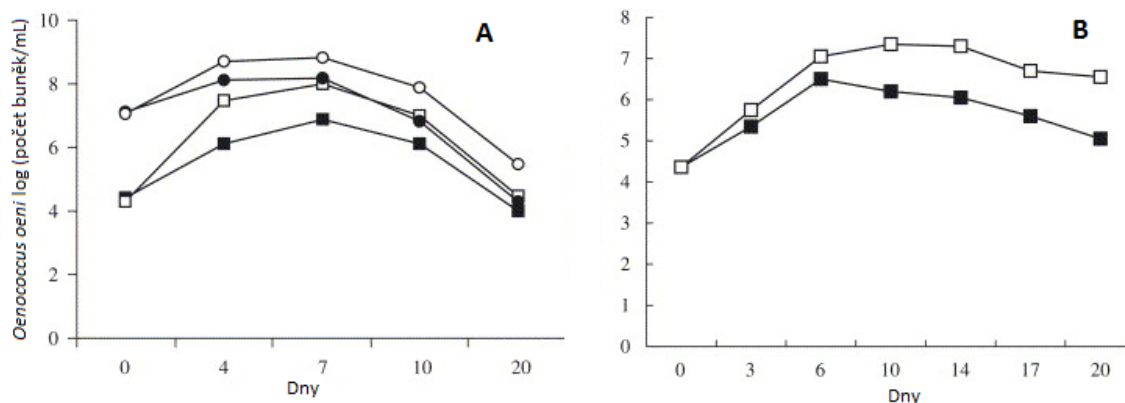
Dobrá kontrola. Jistota úplné alkoholové fermentace – suchého vína. Není nutné brát takový zřetel na pH z důvodu absence cukrů (nehrozí rapidní nárůst těkavých kyselin). Již možný vysoký obsah alkoholu. Výhodné zajistit autolýzu jemných kvasničných kalů k zajištění výživy.



BOK A BARRIQUE?

Jedním z nejaktuálnějších témat enologie posledních let je BOK v sudech typu barrique. Z empirických zkušeností je zřejmé, že BOK v sudech vykazuje lepší výsledky, než v případě nerezových tanků. Ani zařazení mikrooxidátorů a pečlivé dávkování kyslíku nepřináší stejnou kvalitu vín, jako je tomu v prostředí sudu, obzvláště páleného. Dokonce byly provedeny experimenty s extrakty dubového dřeva, ale ani ty nevedly ke stejně pozitivním výsledkům, jako je tomu v případě sudů.

Jedním z vysvětlení se ukázala být přítomnost vanilinu, který se extrahuje z páleného dřeva a pozitivně stimuluje populaci bakterií (viz Graf 1 A).



Graf 1: A – Vliv přídavku vanilinu (1,5 mg/L) na populaci *Oenococcus oeni* při dvou různých počátečních koncentracích buněk, plné znaky kontrola, prázdné znaky

s přidavkem vanilinu; **B** – Vliv přítomnosti dubových pálených hoblin na populaci *Oenococcus oeni*, plné znaky kontrola, prázdné v přítomnosti hoblin.

Jak ukazuje Graf 1 B, přítomnost páleného dubového dřeva (v případě grafu, hoblin) také pozitivně stimuluje populaci bakterií. Především v kombinaci s jemným a přirozeným dávkováním kyslíku přes stěny sudu lze dosáhnout nejlepších výsledků BOK.

Z praktických zkušeností lze pro šetření nákladů doporučit práci s materiálem, který právě prochází BOK. Rozočkování takto rozběhnutými bakteriemi je z hlediska tolerance k prostředí tou nejpřirozenější cestou a ušetří spoustu nákladů na koupi malolaktických bakterií pro každou šarži zvlášť. Dalším častým problémem je nedostatečně dlouhá perioda pro redukci post-malolaktických tónů ve víně. Pokud jsou po BOK kaly v pořádku, jejich promícháváním se víno dopuje látkami zvyšující jeho plnost a hustotu, stabilizuje se barva a zvyšuje se celková stabilita proti zákalům. Mimo to dochází vlivem silného redukčního potenciálu k redukci zmíněných post-malolaktických tónů. Především onoho mléčného charakteru. Celý proces musí probíhat bez přidavku SO₂ a využívá tak přirozenou antioxidační kapacitu vína. Takto vyrobená vína následně vykazují dlouhou životnost a možnost archivace, jelikož jsou na mikrooxidaci v podstatě zvyklá.

Na závěr je nutné konstatovat, že BOK je jeden z nezákladnějších kroků ovlivňující budoucí víno a měl by být optimalizován pokud možno v co nejširším rozsahu podmínek. Správné provedení a obzvláště vhodná kombinace se sudem ústí ve vína vysoké kvality. Objektivně je nutné také zmínit, že použití sudů typu barrique s sebou nese značnou pracnost a s tím spojené náklady. V tom případě je dobré selektovat pouze tu nejlepší surovinu pro tento typ vín. V opačné situaci se může tato technologie ukázat jako značně nerentabilní.

POUŽITÁ LITERATURA:

REVEL G., BLOEM A., AUGUSTIN M., LONVAUD-FUNEL A., BERTRAND A.: Interaction of *Oenococcus oeni* and oak wood compounds. *Food Microbiology*, Volume 22, Issue 6, December 2005, Pages 569-575.

HERNÁNDEZ-ORTE P., LAPEÑA A. C., ESCUDERO A., ASTRAIN J., BARON C., PARDO I., POLO L., FERRER S., CACHO J., FERREIRA V.: Effect of micro-oxygenation on the evolution of aromatic compounds in wines: Malolactic fermentation and ageing in wood. *Food Science and Technology*, Volume 42, Issue 1, 2009, Pages 391-401.