Obr. 1 Mikrobiálna analýza Pinot noir rosé, s intenzívnou „bretty“ arómou. Táto analýza preukázala kolónie *Brettanomyces bruxellensis (*Petriho miska vľavo) s hubou *Penicillium carneum* (Petriho miska vpravo), ktoré majú vysokú depsidázovú aktivitu.

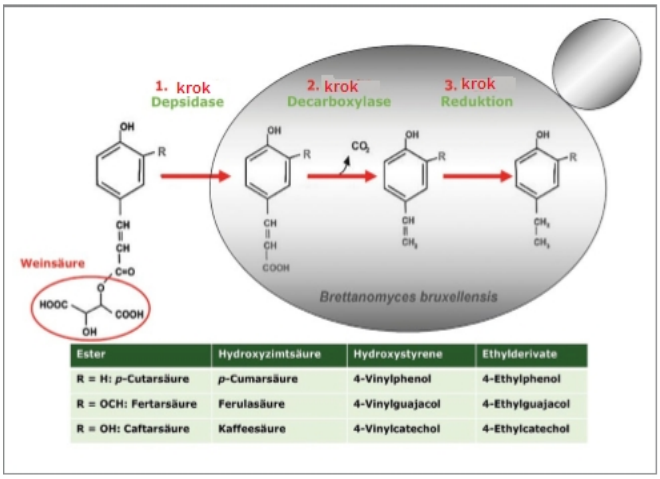
Kriminálny komplici

Depsidázová aktivita a pôsobenie *Brettanomyces bruxellensis*

Ako súčasť prirodzenej mikroflóry viniča sú aj kvasinky rodu *Brettanomyces* a nemožno ich podceňovať. Klimatickými zmenami si stále častejšie nachádzajú cestu do vínnych pivníc aj v severnejších vinárskych regiónoch. Eric Hüfner, Anne Besier, Florian Kraft, Hannes Weninger a Jürgen Fröhlich, Erbslöh Geisenheim AG, podávajú informácie o vplyve depsidázy, ktorú majú kvasinky *Brettanomyces bruxellensis.*

Všeobecne platí, že prítomnosť kvasiniek *Brettanomyces* enológovia posudzujú kriticky a vína s intenzívnou „bretty“ arómou sú častokrát kritizované. Hoci je rod kvasiniek *Brettanomyces* známejší v teplejších južných oblastiach pestovania, Fröhlich a kol. (Nachweis eines Lebenkunstlers, dwm, 2005, vydanie 21, str. 26-28) v Reinhessen preukázali, že sa tieto kvasinky nachádzajú čoraz častejšie aj v nemeckých vínnych pivniciach. Zistilo sa, že každá šiesta preskúmaná pivnica je osídlená týmito kvasinkami. Vinári nemali ani tušenia, že sa tieto kvasinky nachádzali u nich v pivnici. Od dokončenia štúdie došlo ku klimatickým zmenám, dochádza k nárastu kvasinkových buniek a tak sa aj zvyšuje počet senzoricky chybných vín. Kvasinka *Brettanomyces* a jej teleomorfná forma *Dekkera* sa označujú ako škodlivé kvasinky, ktoré spôsobujú rôzne pachute vo víne, pri výrobe sektov alebo sherry. V porovnaní koncentrácie fenolových prekurzorov je viac ovplyvňované a napádané červené víno ako biele. Prítomnosť *Brettanomyces* je takmer celosvetová, a tak boli izolované kmene kvasiniek z Afriky, Ameriky, Austrálie a z Európy. Senzorický vplyv arómy „bretty“ spôsobuje 4-etyl-fenol a ostatné prchavé látky (viď obr. 3), ktoré sa môžu uvoľniť z prekurzorov *Brettanomyces,* ktoré sa vo víne prejavujú ako konský pot (obr. 2) alebo myšina. Tieto kvasinky v priebehu výroby vína, sú zodpovedné za vznik prchavých kyselín a zodpovedajúcich etylesterov.

Existuje vysoká alkoholtolerancia



Ester	Hydroxyzimtsäure	Hydroxystyrene	Ethylderivate
R = H: *p*-Cutarsäure	*p*-Cumarsäure	4-Vinylphenol	4-Ethylphenol
R = OCH: Fertarsäure	Ferulasäure	4-Vinylguajacol	4-Ethylguajacol
R = OH: Caftarsäure	Kaffeesäure	4-Vinylcatechol	4-Ethylcatechol

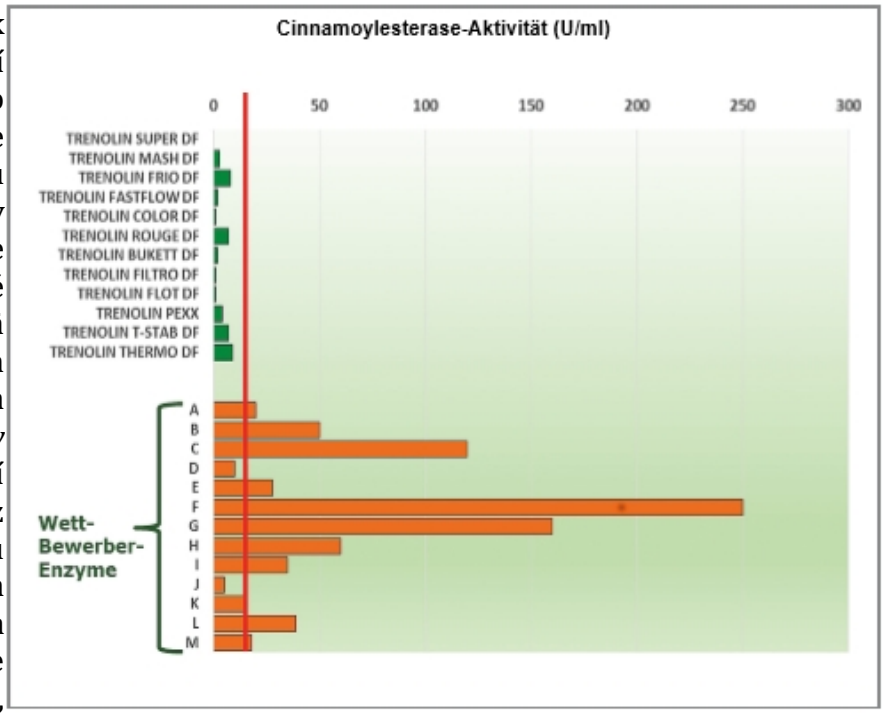
Kvasinky tvoria biogénne amíny, ako je fenyletylamín, ktorý im umožňuje prežívať aj pri vyššom obsahu alkoholu ako je 15%. Tie v porovnaní so *Saccharomyces cerevisiae*, majú nižšiu schopnosť kvasenia, a to vedie k pomalšiemu rastu, počas vysokej alkoholtolerancie, pri nízkej koncentrácii kyseliny octovej, majú dlhú životnosť v infikovanom mušte alebo vo víne. Častokrát sa nachádzajú v nevyčistených drevených sudoch alebo v barikových sudoch a to aj v prípadoch že množstvo kvasničných buniek je veľmi nízke. V tomto kontexte býva často diskutovaná téma chýbajúcej hygieny v pivnici a tiež náchylnosť nových drevených sudov, ktoré v procese opaľovania pripravujú živné podmienky produktami štiepenia štruktúry dreva. Štiepne produkty degradácie dreva ako sú oligosacharidy a disacharidy (napr.

cellobióza) poskytujú vhodné podmienky pre rozmnožovanie kvasiniek.

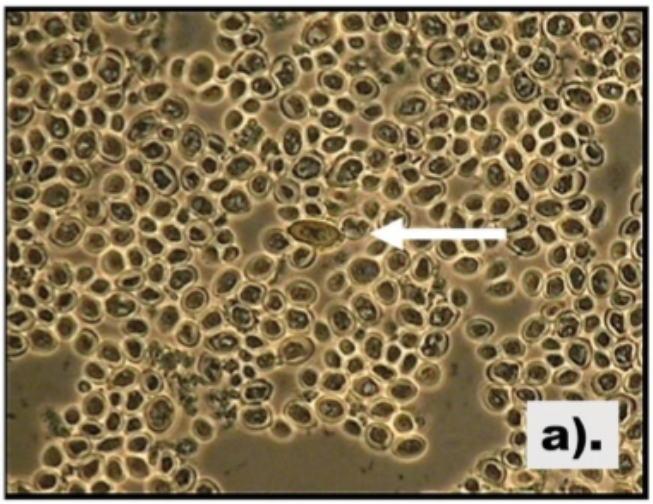
Rôzne kmene kvasiniek majú rôznu alkoholtoleranciu, podobne sú na tom aj kvasinky, ktoré sú schopné vytvárať na povrchu svojej bunkovej steny ochranný film. Niekedy možno nájsť rôzne kmene kvasiniek rodu *Brettanomyces* v symbióze s plesňami (v mušte, obr. 1) alebo s baktériami mliečneho kvasenia ako sú *Oenococcus, Pediococcus* a *Lactobacillus.* Tieto sa výrazne odlišujú vo svojej metabolickej aktivite a teda dokážu pružne reagovať na výživové podmienky a vzájomne si pomáhajú spracovať ťažšie spracovateľné živiny. Takýto biologický film sa tvorí aj z toho dôvodu, že stredná hodnota sírenia <40 mg SO2/l, nevedie k bunkovej smrti, ale je ovplyvená rastová schopnosť. Dostupnosť niektorých prekurzorov, ako už bolo uvedené, sa spája s metabolickou aktivitou iných mikroorganizmov. Tak dlho ako sa esterifikujú fenolové prekurzory s hydroxykarboxlovými kyselinami, ako je napr. kyselina vínna, tak vznikajú takzvané *depsidy* prostredníctvom kvasiniek *Brettanomyces*

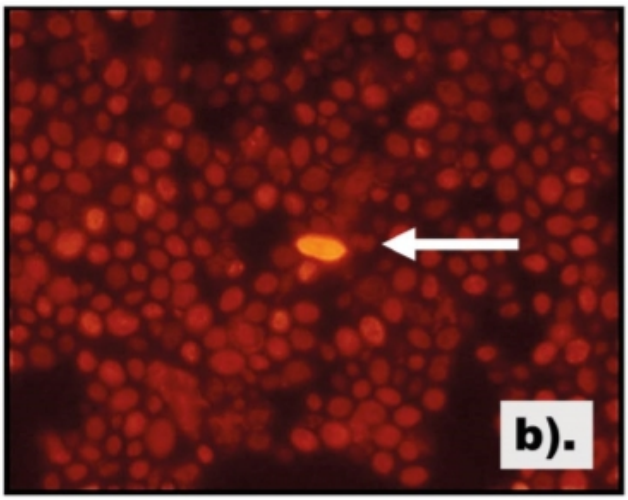
Neošetrené enzýmy vo vinárstve napomáhajú k tvorbe „bretty“ arómy cez depsidázy

Enzým cinnamoyl-esteráza, známy tiež ako *depsidáza*, katalyzuje tento prvý krok určujúci rýchlosť v reakcii pri uvoľňovaní prchavých fenolov (obr. 3). Iba niekoľko vínnych mikroorganizmov, ako sú baktérie mliečneho kvasenia, majú túto enzýmovú aktivitu. Avšak *depsidáza* ako vinársky enzým môže mať nežiadúce vedľajšie aktivity. Predovšetkým pektinázy, ktoré produkujú kmene vláknitých húb, najmä *Apergillus niger*, obsahujú tento enzým prirodzene. (Burkhardt, 1976, Barbe a Dubourdieu, 1998). Popis *depsidázy* odkazuje na rôzne enzýmy z kategórií chlórových hydroláz (ES 3.1.1.42) a esteráz kyseliny ferulovej (ES 3.1.1.73), ktoré majú vplyv na prekurzory kyselín vínnej a hydroxyškoricovej. *Aspergillus niger* vytvára depsidázu ako pomocný enzým pre lepšie využitie rastlinných živín, ako je pektín, xylán alebo lignocelulóza (de Vries a kol., 2002) – vo víne však vedie v negatívnym senzorickým účinkom (Hasselbeck, 1997).



Na základe tohto je dôležité pri vinárskych enzýmoch nemať ako ich súčasť depsidázovú aktivitu. Medzinárodná organizácia pre vinič a víno (OIV) sa už veľa rokov zaoberala touto problematikou a základom pre toto boli odporúčania „špecifikácie enologických výrobkov“, kde sa zverejňujú účinky a zloženie enzymatických prípravkov, ktoré majú cinnamoylesterázu. Erbsloh zabezpečuje prostredníctvom náročného procesu čistenia to, že *depsidáza* je účinne oddelená od žiadaných enzymatických aktivít, ako je pektináza a tým nie je prítomná v konečnom produkte. Hraničná koncetrácia je 15 depsidázových jednotiek na ml alebo gram, v porovnaní s rôznymi konkurenčnými produktami (obr. 4). V súčastnosti z hľadiska technológie výroby enologických enzýmov nemôže každý výrobca vinárskych enzýmov zabezpečiť nízku koncentráciu *depsidázy*. V mnohých prípadoch skúmanej *despidázy* je jej aktivita diskutabilná, lebo aj iné hodnoty ako 30-50 jednotiek/ml môžu spôsobovať senzorické abnormality. Je to čiastočne z dôvodu nízkej prahovej koncentrácie prchavých fenolov niekoľko 100 µg/l, ale aj to, že už sa znižuje koncentrácia látok na báze ovocnosti hlavne u bielych vín a kvalita vína býva narušená (Chatonnet a kol., 1993).





Analýza *Brettanomyces* pomocou fluorescenčnej in situ hybridizácie

Pre mikroskopickú identifikáciu rôznych druhov *Brettanomyces* sa osvedčila fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH), pre rýchlu a spoľahlivú identifikáciu mikroorganizmov v ich prirodzenom prostredí. Významný pokrok v tomto odbore bol dosiahnutý vývojom DNA vedľajších prób, podľa Rodera a kol. (2007), čo viedlo k optimalizácii hybridizačného signálu v teste FISH (obr. 5A a 5B).

Môže byť vyliečená „bretty“ aróma?

Väčšina odporúčaní pre riešenie „bretty“ arómy a chute sa týkajú zníženia prchavých fenolových zlúčenín. Pri iných prchavých zlúčeninách, ako je kyselina octová, možno pomôcť rôznymi opatreniami, na druhej strane sú zákonné limity, ktoré ovplyvňujú predajnosť. Taktiež liečba cudzorodých tónov a myšiny je veľmi náročná, a len málo krát úspešná. Úspech môže priniesť použitie kazeínu ako číriaceho prostriedku. Ako preventívne opatrenia na odstránenie fenolových látok sa využíva aktívne uhlie (Granucol GE), technické postupy, ako je použitie reverznej osmózy, skladovanie inaktívnych kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae,* alebo použitie prípravkov na báze bunkových stien (PuroCell O). Lipofilné vlastnosti cytoplazmatickej membrány výrazne podporujú väzbu prchavých fenolov. Ak je prítomný ešte nejaký skvasiteľný zvyškový cukor, môže sa vykonať preočkovanie s aktívnymi vínnymi kvasinkami rodu *bayanus (*Oenoferm X-treme, Oenoferm Freddo alebo Oenoferm Color). Kmene kvasiniek rodu *bayanus* sú charakterizované tým, že aj pri nízkom obsahu živín sú schopné metabolizovať zvyškové cukry a pokračovať tak s viazaním aktívnych fenolových zlúčenín. Všeobecné opatrenia sú uvedené nižšie.

Odporúčania, ktoré, zabraňujú infekcii kvasinkami *Brettanomyces,* alebo môžu zmierniť senzorické vlastnosti sú nasledovné:

- používať len zdravé hrozno
- používať len enzým, ktoré neobsahujú *depsidázu*. Všetky enzýmy Trenolin od firmy Erbsloh sú DF (bez depsidázy)
- skoršie použitie oxidu siričitého (zohľadňovať toleranciu na oxid siričitý pri štartovacích kultúrach pri MLF)
- simultánne jablčno-mliečne kvasenie
- použitie chitózanu (nie pred alebo počas kvasenia)
- zamedziť krížovej kontaminácii (nedávať víno späť do infikovaných sudov)
- používanie silno kvasiacich kmeňov kvasiniek Oenoferm bayanus

Čiastočná likvidácia „bretty“ arómy možno vykonať pomocou:

- kvasinkových bunkových stien alebo inaktívnymi kvasinkami
- aktívnym uhlím

Zdroj : das deutsche weinmagazin · 29. August 2015 ·

ERBSLÖH

bratislava unimpex