

## Pentachlorfenolát sodný jako antiseptikum při lihovém kvašení

MILAN ROSA, Výzkumný ústav lihovarského a konzervářského průmyslu, Praha

663.5

### Úvod

Použití chlorovaných derivátů fenolu k potlačování infikujících mikroorganismů v kvasných výrobcích bylo zkoušeno v mnoha státech. Dyr, Krumphanzl a Hauzar [1] provedli celkový rozbor použití dezinfekčních činidel při výrobě melasového lihu. Stanovili, že koncentrace 0,001 %ního pentachlorfenolátu sodného (1 mg/100 ml) značně potlačuje růst infekčních mléčných bakterií, aniž by byla příliš narušena kvasná schopnost kvasinek. Podobné výsledky uvádí Konovalov [2] na záparách ze škrobnatých surovin s tím, že koncentrací pentachlorfenolátu sodného (dále PCHF) do 0,002 % je zbrzdováno kvašení pouze v prvních hodinách kvašení, což je později vyrovnáno, takže celková kvasná doba proti kontrole není prodloužena. Teprve vyšší koncentrace PCHF zpomaluje kvašení ve všech fázích. Množství 0,004 % (4 mg PCHF/100 ml) zastavuje kvašení úplně. V rozporu s uvedeným je zpráva australské firmy Colonial Sugar Refining Co., Melbourne [3], že přídavek pentachlorfenolátu sodného v množství 40 p. p. m., tj. 4 mg/100 ml při výrobě lihu z melasy zabrání nejen infekci, ale zvýší poněkud i výtěžek alkoholu.

V následující práci jsou uvedeny výsledky laboratorního přezkoušení pentachlorfenolátu sodného jako antiseptika při zkvašování melasy na líc.

### Metodika

Pro pokusy bylo použito kmene lihovarských kvasinek LK 4 (Sbírka VÚLK). Jako substrátu pro přípravu inokula kvasinek a vlastní pokusy bylo použito melasy zředěné na 14° Bg, okyselené kyselinou sírovou na pH 5,0 s přídavkem 0,1 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Sterilováno v proudící páře 3krát po šedesáti minutách v intervalech po 24 hodinách. Roztok pentachlorfenolátu sodného je přidáván před zaočkováním. Pro kultivaci mléčných bakterií bylo použito rajčatového substrátu: 400 ml šťávy z rajských jableček, 10 g peptonu, 50 ml kvasničného autolyzátu 1 : 1,2 g glukózy, vody do 1000 ml.

Kultivace byly prováděny v termostatu při 30° C.

Rychlost anaerobního kvašení byla stanovena měřením vznikajícího kyslíčnicku uhličitého ve Warburgově manometrickém přístroji. Teplota lázně přístroje byla 30° C, atmosféra — dusík, zbavený zbytků kyslíku vedením přes měděné hobliny, zahřáté na 600° C. Činnost mléčných infekčních bakterií byla sledována v zahnutých plynovkách tvorbou kyslíčnicku uhličitého uvolněného vznikající kyselinou mléčnou z  $\text{NaHCO}_3$ , přidávaného do substrátu.

Pro kvalitativní určení cukrů a průběhu inverze sacharózy bylo použito sestupné rozdělovací chromatografie na papíře. Kvantitativní stanovení cukrů bylo prováděno metodou podle Bertranda, acidita potenciometrickou titrací vzorků po zbavení kyslíčnicku uhličitého.

### Pokusná část

Vliv pentachlorfenolátu sodného na činnost mléčných bakterií byl sledován v zahnutých plynovkách. Do rajčatového substrátu byl přidáván uhličitán sodný v množství 2 g/100 ml. Jako indikátor růstu mléčných bakterií a vytváření kyseliny

mléčné sloužil kyslíčnicku uhličitý uvolněný kyselinou z  $\text{NaHCO}_3$ . Směsná kultura čtyř laktobakterií (*Lactobacterium buchnerii*, *L. brevis*, *L. vermiciformis*, *L. plantarum* — izoláty z provozních infikovaných melasových zápar — sbírka VÚLK) byla předkultivována na rajčatové půdě při 30° C. Po 48 hodinách narostlou směsnou kulturou byly zaočkovány substráty s přídavkem PCHF a v plynovkách byl substrát převrstven sterilním parafinovým olejem. Koncentrace antiseptika v pokusech byla 0 až 5 mg PCHF/100 ml. Tvorba plynu byla zaznamenávána v intervalech po 24 hodinách. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Z výsledků uvedených v tabulce 1 lze vyvozovat, že pentachlorfenolát sodný působí inhibičně i v ma-

Tabulka 1

Vytváření kyseliny mléčné směsnou kulturou infekčních mléčných bakterií za přídavku PCHF

| Koncentrace PCHF mg/100 ml | Uvolňování $\text{CO}_2$ ze substrátu |      |      |      |       |       |       |
|----------------------------|---------------------------------------|------|------|------|-------|-------|-------|
|                            | 24 h                                  | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h | 144 h | 168 h |
| Nezaočkováná kontrola      | —                                     | —    | —    | —    | —     | —     | —     |
| Zaočkováná kontrola        | —                                     | +++  | +++  | +++  | +++   | +++   | +++   |
| 0,1                        | —                                     | >0   | +++  | +++  | +++   | +++   | +++   |
| 0,5                        | —                                     | —    | —    | +++  | +++   | +++   | +++   |
| 1,0                        | —                                     | —    | —    | —    | +++   | +++   | +++   |
| 5,0                        | —                                     | —    | —    | —    | —     | —     | —     |

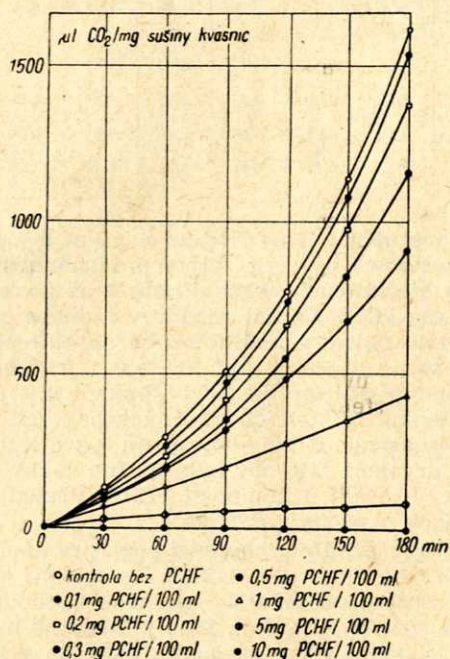
lých dávkách na mléčné bakterie. Již koncentrace 0,1 mg/100 ml zbrzdila činnost bakterií o 24 hodin, dávka 1 mg/100 ml o 72 hodin a koncentrace PCHF 5 mg/100 ml zabránila zcela jejich činnosti. Ve shodě s tvorbou  $\text{CO}_2$  byl též mikroskopický obraz i vzhled substrátu, který se po rozmnožení bakterií zakalil.

Pro stanovení účinku PCHF na kvasinky bylo použito techniky podle Warburga. Lihovarský kmen kvasinek LK 4, provozní kmen lihovaru v Pardubicích (sbírka VÚLK) byl předkultivován na melasové zápare hustoty 14° Bg s přídavkem 0,1 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a její pH bylo upraveno kyselinou sírovou na 5,0. Kvasinky z prokvašené zápary byly odděleny odstředěním a promyty fyziologickým roztokem. Suspenze ve vodě byla použita k měření kvasného kyslíčnicku uhličitého za anaerobních podmínek. Substrát byla tatáž melasa. Vedle kontrolního substrátu bez PCHF byla zkoušena množství 0,1 až 10 mg/100 ml. Doba měření byla 180 minut a množství vzniklého  $\text{CO}_2$  bylo zaznamenáváno v intervalech 30 minut. Teplota lázně Warburgova přístroje byla 30° C, počet kyvů 100/min při amplitudě 6 cm. Stanovené hodnoty v  $\mu\text{l CO}_2/\text{mg}$  sušiny kvasnic v závislosti na čase jsou znázorněny na obr. 1.

Výsledky uvedené na obr. 1 dokazují, že PCHF ovlivňuje i činnost kvasinek, i když ve srovnání s jeho vlivem na infekční mléčné bakterie v daleko menší míře. Do koncentrace 0,5 mg PCHF/100 ml není rychlost kvašení podstatně snížena, zdržení



nastává v samém začátku kvašení, ale postupně se směr křivek tvorby  $\text{CO}_2$  stává rovnoběžným. Při koncentraci 1 mg PCHF/100 ml je zřetelný pokles kvasné rychlosti po dobu sledování, ale křivce vzniku  $\text{CO}_2$  zůstává stoupavá tendence. Při 5 mg PCHF/



Obr. 1. Vliv pentachlorfenolátu sodného na činnost kvasinek v melasovém substrátu

Tabulka 2

Sestavení pokusů s PCHF

| Označení pokusu | Koncentrace PCHF mg/100 ml | Množství v ml     |                     |             |                  |      |
|-----------------|----------------------------|-------------------|---------------------|-------------|------------------|------|
|                 |                            | melasový substrát | infikovaný substrát | kvas. susp. | roztok PCHF      | voda |
| 1               | 0                          | 265               | —                   | 20          | —                | 15   |
| 2               | 0                          | 250               | 15                  | 20          | —                | 15   |
| 3               | 0,1                        | 265               | —                   | 20          | 15<br>2 mg/100   | —    |
| 4               | 0,1                        | 250               | 15                  | 20          | 15<br>2 mg/100   | —    |
| 5               | 0,5                        | 265               | —                   | 20          | 15<br>10 mg/100  | —    |
| 6               | 0,5                        | 250               | 15                  | 20          | 15<br>10 mg/100  | —    |
| 7               | 1,0                        | 265               | —                   | 20          | 15<br>20 mg/100  | —    |
| 8               | 1,0                        | 250               | 15                  | 20          | 15<br>20 mg/100  | —    |
| 9               | 5,0                        | 265               | —                   | 20          | 15<br>100 mg/100 | —    |
| 10              | 5,0                        | 250               | 15                  | 20          | 15<br>100 mg/100 | —    |

100 ml se přírůstek objemu uvolněného kyslíčnicku uhličitého zmenšují a směr křivky ukazuje na zastavování kvašení. Při dávce PCHF 10 mg/100 ml kvašení vůbec nenastalo.

Na základě uvedených výsledků pokusů byl sledován vliv PCHF na kvašení sterilních i uměle infikovaných melasových substrátů. Směs mléčných bakterií byla pro tento účel předkultivována na melasovém substrátu. Sestavení pokusů je uvedeno v tabulce 2.

Po 24hodinovém kvašení při teplotě  $30^\circ \text{C}$  byl ve všech pokusech stanoven obsah cukru a acidita. Chromatograficky byl kvalitativně zachycen stav přítomných cukrů a postup inverze sacharózy. U uměle infikovaných pokusů byla acidita stanovena ještě po dalších 24 hodinách.

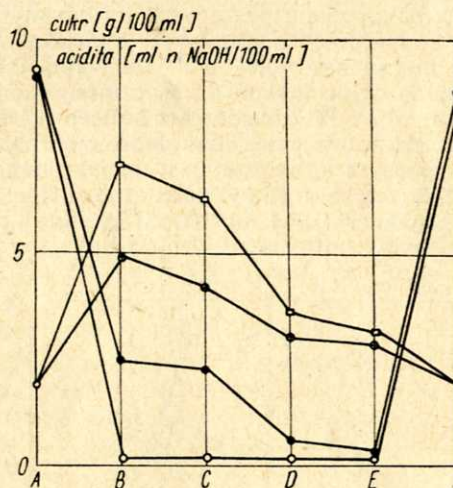
V tabulce 3 jsou uvedeny nalezené hodnoty. Čísla pokusů jsou shodná s označením pokusů v tabulce 2. Na obr. 2 jsou výsledky znázorněny graficky.

Z uvedeného lze udělat uzávěr, že při kvašení neinfikovaných zápar přidavek PCHF do koncentrace 1 mg/100 ml neovlivňuje podstatně průběh kvašení. Jinak je tomu u pokusů, kde byl melasový substrát uměle infikován mléčnými bakteriemi. V kontrolním pokuse bez přídavku antiseptika nastal vzestup acidity o 2,97 ml  $n \text{ NaOH}/100 \text{ ml}$ . Přídavkem 0,1 mg PCHF/100 ml se snížil tento přírůstek na 2,26 ml (snížení o 24 %), při koncentraci 0,5 mg byl přírůstek acidity 1,10 ml (snížení o 63 %) a při

Tabulka 3

Vliv PCHF na kvašení infikovaných a neinfikovaných melasových zápar

| Označení pokusu | Start kvašení |      | 24 h    |      | 48 h    |
|-----------------|---------------|------|---------|------|---------|
|                 | acidita       | cukr | acidita | cukr | acidita |
| 1               | 1,60          | 9,28 | 2,32    | 0,14 | —       |
| 2               | 1,88          | 9,04 | 4,85    | 2,42 | 7,06    |
| 3               | 1,60          | 9,28 | 1,97    | 0,16 | —       |
| 4               | 1,88          | 9,04 | 4,14    | 2,23 | 6,26    |
| 5               | 1,60          | 9,28 | 2,02    | 0,16 | —       |
| 6               | 1,88          | 9,04 | 2,98    | 0,56 | 3,56    |
| 7               | 1,60          | 9,28 | 2,13    | 0,15 | —       |
| 8               | 1,88          | 9,04 | 2,81    | 0,27 | 3,10    |
| 9               | 1,60          | 9,28 | 1,84    | 8,46 | —       |
| 10              | 1,88          | 9,04 | 1,87    | 8,72 | 1,79    |

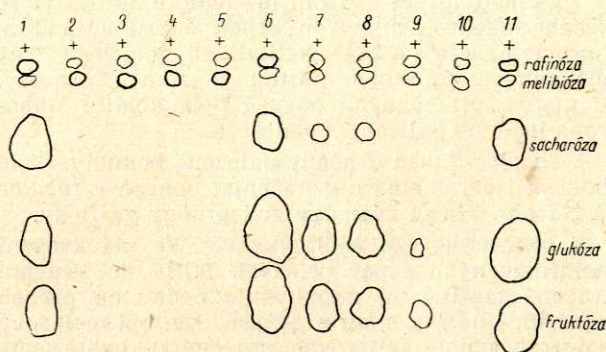


- cukr neinfikovaných pokusů
- cukr infikovaných pokusů
- acidita infikovaných pokusů po 24 hod
- acidita infikovaných pokusů po 48 hod

Obr. 2. Vliv pentachlorfenolátu sodného na kvašení infikovaných i neinfikovaných melasových zápar.

Stav po 24 hodinách  
A — Start kvašení; B — Kontrola bez PCHF; C — 0,1 mg PCHF/100 ml; D — 0,5 mg PCHF/100 ml; E — 1,0 mg PCHF/100 ml; F — 5,0 mg PCHF/100 ml.





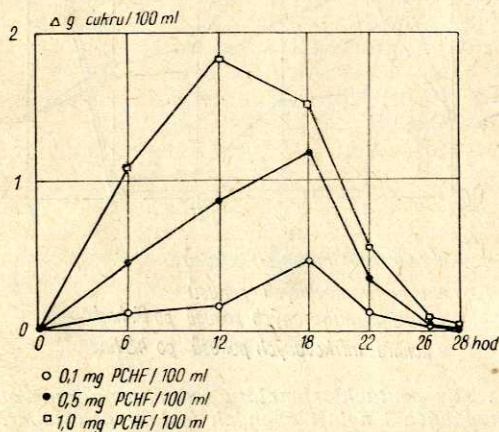
Obr. 3. Chromatogram stavu kvašení infikovaných i neinfikovaných pokusů po 24 hodinách

1 — start kvašení; 2 — kontrola bez infekce; 3 — 0,1 mg PCHF/100 ml bez infekce; 4 — 0,5 mg PCHF/100 ml bez infekce; 5 — 1 mg PCHF/100 ml bez infekce; 6 — 5 mg PCHF/100 ml bez infekce; 7 — kontrola s infekcí; 8 — 0,1 mg PCHF/100 ml s infekcí; 9 — 0,5 mg PCHF/100 ml s infekcí; 10 — 1 mg PCHF/100 ml s infekcí; 11 — 5 mg PCHF/100 ml s infekcí

1 mg PCHF/100 ml se snížil přírůstek acidity na 0,93 ml (69 %). V přímé závislosti je i obsah cukru po 24 hodinách kvašení infikovaných substrátů. Snižuje se se stoupající koncentrací PCHF do množství 1 mg/100 ml, které bylo již dříve určeno jako koncentrace neovlivňující příliš rychlost kvašení. Z uvedeného jasně vyplývá, že kontaminující mléčné bakterie omezují v daleko větší míře činnost kvasinek než PCHF, takže při kvašení infikovaných substrátů pentachlorfenolát sodný kvašení nezpomaloval, ale naopak zrychloval. Snížení acidity infikovaných pokusů je ještě markantnější po 48 hodinách kvašení.

Uvedený chromatogram (obr. 3) potvrzuje předešlé výsledky. Na chromatogramu je vidět, že infikující mléčné bakterie zpomalují i postup in verze sacharózy neboť v infikovaném pokuse bez PCHF a s přidavkem 0,1 mg/100 ml je po 24 hodinách kvašení sacharóza ještě přítomna. Koncentrace 5 mg PCHF/100 ml v pokusech s infekcí i bez ní zastavila kvašení i inverzi sacharózy.

Při mikroskopickém pozorování infikovaných pokusů po 24 hodinách kvašení byly kvasinky v kontrolním pokuse bez PCHF a s přidavkem 0,1 mg/100 ml silně aglutinované a zásev infekčních bakterií velmi silný. Při koncentraci antiseptika 0,5 mg byla však již aglutinace velmi slabá, v zorném poli mikroskopu byla převážná část buněk jednotlivě. Počet mléčných bakterií byl podstatně snížen. V pokuse s obsahem PCHF 1 mg/100 ml kvasinky aglutinované nebyly a infekce byla velmi slabá.



Obr. 4. Rozdíly obsahu cukru kvasných pokusů s přidavkem PCHF proti kontrole bez antiseptika

Tabulka 4  
Kvašení melasových substrátů s přidavkem pentachlorfenolátu sodného

| Koncentrace PCHF mg/100 ml | Obsah cukru v g/100 ml |      |      |      |      |      |      |
|----------------------------|------------------------|------|------|------|------|------|------|
|                            | 0 h                    | 6 h  | 12 h | 18 h | 22 h | 26 h | 28 h |
| 0                          | 9,61                   | 8,18 | 4,77 | 0,80 | 0,17 | 0,15 | 0,15 |
| 0,1                        | 9,61                   | 8,30 | 4,93 | 1,27 | 0,29 | 0,18 | 0,14 |
| 0,5                        | 9,61                   | 8,64 | 5,65 | 2,00 | 0,53 | 0,19 | 0,15 |
| 1,0                        | 9,61                   | 9,28 | 6,61 | 2,32 | 0,73 | 0,22 | 0,16 |

Pro zpřesnění vlivu PCHF na kvašení bez infikujících mléčných bakterií, kdy v předcházejícím pokuse po 24 hodinách kvašení nebylo až do koncentrace 1 mg PCHF/100 ml rozdílu v hloubce prokvašení, avšak výsledky měření Warburgovou technikou ukázaly na zpomalování kvašení i malými dávkami tohoto antiseptika, byly opakovány pokusy bez přidavku infikujících mléčných bakterií. Obsah cukru v substrátech byl stanovován v kratších časových intervalech tak, aby bylo možno zachytit zpomalování kvašení přítomností PCHF. Výsledky sledování jsou uvedeny v tabulce 4.

Hodnoty uvedené v tabulce 4 potvrzují nepříznivý vliv PCHF na činnost kvasinek. Zpomalení kvašení nastává hlavně na začátku kvasného pochodu a ke konci se rozdíly zmenšují. Toto je názorně uvedeno na obr. 4, kde jsou v závislosti na čase vyneseny rozdíly obsahu cukru pokusů s PCHF proti kontrole.

#### Souhrn

Byly provedeny laboratorní pokusy k potlačení infikujících mléčných bakterií při výrobě lihu z melasy pentachlorfenolátem sodným. Bylo zjištěno, že PCHF již v nízkých koncentracích potlačuje činnost a růst laktobakterií. V pokusech, kdy byly zakvašovány lihovarským kmenem kvasinek uměle infikované melasové substráty s přidavky různých množství PCHF, snížila koncentrace 0,1 mg PCHF/100 ml přírůstek acidity proti kontrole bez antiseptika o 24 % a přidavkem 1 mg PCHF/100 ml nastalo snížení acidity o 69 %.

Pentachlorfenolát sodný však působí nepříznivě i na samotné kvasinky. V pokusech, kdy byly za přidavků různých koncentrací PCHF zakvašeny lihovarskými kvasinkami sterilní melasové zápary, bylo zjištěno zpomalování kvašení vlivem přidaného antiseptika. Po 22 hodinách kvašení bylo v kontrolní zápaře bez PCHF odkvašeno 99,8 % zkvasitelných cukrů, za přidavku 0,1 mg PCHF/100 ml ještě 98,5 % a při koncentraci antiseptika 1 mg/100 ml již jen 93,8 % cukrů. Po dalších čtyřech hodinách kvašení byl v kontrole bez antiseptika zkvašen veškerý zkvasitelný cukr a při koncentraci 1 mg PCHF/100 ml 99,2 %. Hlavní zpomalení kvašení nastává v prvních fázích kvašení a ke konci se rozdíly zmenšují.

Pokusy však bylo dokázáno, že v případě silně infikovaných zápar pentachlorfenolát sodný naopak kvašení urychluje. Infekční mléčné bakterie zpomalují kvašení v daleko větší míře než přidané antiseptikum, které nepříznivý vliv infekce eliminuje. Infikovaný pokus bez PCHF po 24 hodinách kvašení měl zbytkový cukr 2,42 g/100 ml (cukr počáteční 9,04 g/100 ml), s přidavkem 0,1 mg PCHF — 2,23 g cukru/100 ml a při koncentraci PCHF 1 mg/100 ml byl zbytkový cukr infikovaného pokusu jen 0,27. Koncentrace antiseptika 5 mg/100 ml již zcela in-



hibuje činnosť, tak i kvasiniek, takže v úvode citovaný údaj firmy Colonial Sugar Refining Co. Melbourn není možno potvrdiť.

Na základe provedených pokusů lze vyvozovať, že pentachlorfenolátu sodného jako antiseptika při lihovém kvašení by bylo možno s úspěchem použít v koncentraci do 1 mg/100 ml při kvašení značně infikovaných melasových zápar.

#### ПРИМЕНЕНИЕ ПЕНТАХЛОРО- ФЕНОЛАТА НАТРИЯ В КАЧЕСТВЕ АНТИСЕПТИКА ПРИ СПИРТОВОМ БРОЖЕНИИ

V статье приводятся результаты экспериментов проведенных в лабораторном масштабе по подавлению инфекции вызванной при производстве спирта из мелассы бактериями молочного брожения путем введения в чаны малых количеств пентахлорфенолата натрия. В дальнейшем предлагается новый метод определения максимальной и минимальной концентраций антисептика.

#### NATRIUMPENTACHLORPHENOLAT ALS ANTISEPTIKUM BEI DER SPIRITUSGÄRUNG

In dem Artikel werden Versuche beschrieben, bei welchen zur Bekämpfung der Infektion, die durch Milchsäurebakterien bei der Spirituserzeugung aus Melasse verursacht wird, Natriumpentachlorphenolat benutzt wurde. Das Problem der maximalen und minimalen Konzentration wird anhand einer neuen, bisher nicht angewandten Methode gelöst.

#### Literatura

- [1] Dyr J., Krumphanzl V., Hauzar I.: Sborník VŠCHT, oddíl fak. potr. techno. 3. st. 167—98, Praha 1959.
- [2] Konovalov: Mikrobiologia 24, 199 (1955).
- [3] J. Inst. Brew., 61, 78 (1955).

Došlo do redakcie 15. 6. 1960.

#### SODIUM PENTACHLORPHENOLATE AS ANTISEPTIC AT ALCOHOL FERMENTATION

The article describes the results of laboratory experiments with suppressing the infection caused by lactic fermentation bacteria by introducing into the fermenting substance small amounts of sodium pentachlorophenolate. The problem is important for distilleries manufacturing spirit from molasses. A new method is suggested for determining the maximum and minimum contractions of the antiseptic.

## Zloženie kvasničnej flóry hroznových muštov

ERICH MINÁRIK, Výskumný ústav pre vinohradníctvo a vinárstvo, Bratislava

663.12/14

I keď sa používanie čistých kultúr vínnych kvasiniek vo vinárstve čoraz viac rozširuje, najmä vo veľkovýrobe, v mnohých závodoch a v malovýrobných podmienkach obzvlášť ešte prevláda spontánne kvasenie hroznových muštov. Ak odhliadneme od sféry muštov vyrážajúceho časť menej odolných apikulátových kvasiniek, a od odkalovania, znižujúceho všeobecne počet kvasničných buniek, vplyva človeka len málo na zloženie kvasničnej flóry muštov pri samovoľnom kvasení. Pôvodná mikroflóra hrozien je výsledkom prispôbovania rôznym ekologickým podmienkam. Táto flóra je veľmi rozmanitá a pri spontánnom kvasení sa vo veľkej miere zúčastňuje kvasného procesu a podieľa tak aj na vytváraní organoleptických vlastností vín. Z týchto dôvodov je veľmi dôležité poznať zastúpenie a výskyt najdôležitejších skupín kvasiniek na hroznách a v muštoch v priebehu kvasenia.

#### Materiál a metodika

V rámci rozsiahlejšieho štúdia mikroflóry viniča v ČSSR sa v r. 1958 až 1959 skúmala kvasničná flóra hrozien a muštov v malokarpatskej vinohradníckej oblasti v okolí Bratislavy. V dobe zberu hrozna sa odobralo 21 vzoriek hrozna a muštov tečúcich od lisov, z vinohradov a lisovní Bratislavy, Karlovej Vsi, Rače, Vajnora a Sv. Jura, prevážne z JRD a Vinárskych závodov.

Reprezentatívne vzorky boli odobrané za aseptických podmienok, pričom sa dbalo na to, aby sa vzorkovali iba nesfrené a čistou kultúrou nezakvasované mušty. Hrozná sa napred ručne lisovali a potom sa spracovali obdobne ako mušty. V každom prípade sa odoberalo, resp. vylisovalo asi 500 ml muštu do kvasných baniek.

Časť muštu sa spracovávala ihneď, najneskôr do 24 hodín, Kochovou zriedovacou metódou. Z dvoch vhodných zriedení vo fyziologickom roztoku sa pripravili 2 Petriho misky so sladinkovou želatínou.

Osvedčilo sa pridávať do pôdy 0,25 % propionanu sodného k potlačeniu vzrastu plesní [1]. Misky sa inkubovali niekoľko dní pri teplote miestnosti. Vyrástle dobré diferencované kolónie kvasiniek sa po predbežnom makroskopickom vyšetrení oddeľovali zo želatíny platínovým očkom alebo malým prúžkom sterilného filtračného papiera, ktorými sa preniesli do sterilného muštu vo Freudenreichových bankách. Po 3 až 4 dňoch sa rozmnožené kvasinky preočkovali na šikmý sladinkový agar, ktorý sa po rozrástnutí kultúr zalieval sterilným parafínovým olejom. Pred ďalším vyšetrením sa kvasinky vždy občerstvovali z agaru pasážami cez hroznový mušt.

Väčšia zbývajúca časť muštu sa inkubovala pri 25 °C. Po 5 až 6 dňoch a po 30 dňoch sa izolácia kvasiniek opakovala obdobným spôsobom. Tým sa zabezpečila izolácia a podchytenie kvasiniek aktívne vystupujúcich v rôznych fázach kvasenia: pred kvasením, vo fázi búrlivého kvasenia a pri dokvadaní. Priemerne sa z jednej vzorky muštu izolovalo 10 kmeňov. Mnohé kvasničné kmene sa prečisťovali ešte raz buď Kochovou zriedovacou metódou alebo pomocou monosporického izolátora [2].

Jednotlivé kmene boli podrobené identifikačným skúškam podľa metód, ktoré uvádzajú v systematických kvasiniek Lodderová a Kreger van Rijová [3], Lodderová, Slooffová a Kreger van Rijová [4], Kudriavcev [5], Wickerham [6] a Kocková-Kratochvílová [7]. Najdôležitejšie testy asimilačnej a kvasnej schopnosti kvasiniek sa zhodnocovali chromatografickou metódou na papieri [8, 9, 10, 11].

#### Výsledky a ich zhodnotenie

Vyššie uvedeným spôsobom bolo z 21 vzoriek hrozien a muštov izolovaných 222 kmeňov kvasiniek. Na základe podrobných identifikačných skúšok morfológických, fyziologických a biochemických vlastností boli kvasinky klasifikované do 2