

Z výzkumu a praxe

ŠPECIFICKÉ ASPEKTY IZOLÁCIE, KULTIVÁCIE A IDENTIFIKÁCIE VÍNNYCH KVASINIEK

Fedor MALÍK, Anna VOLLEKOVÁ*, Valter VOLLEK, Chemickotechnologická fakulta STU, Bratislava

*Slovenská postgraduálna akadémia medicíny, Bratislava

Kľúčové slová: identifikácia, izolácia, kultivácia, selektívne médium, vínne kvasinky

Napriek predstávam, že populácie vínnych kvasiniek sú na prírodných stanovištiach (pôda, orgány viniča, hrozno) dostatočne zastúpené a dostatočne životaschopné, je potrebné k ich izolácii pristupovať obozretne. Sú známe prípady, že kvasinky izolované z určitého prírodného substrátu môžu byť iba prežívajúcimi kontaminantmi. Na získanie druhov, ktoré sú skutočne reprezentačnými zástupcami v určitom substráte, je potrebné aplikovať diferencované metódy odberu vzoriek a izolácie.

ODBER VZORIEK

Vzorky je nutné brať z rovnakého stanovišta opakovane a v primeraných časových intervaloch, čo umožňuje reprodukovateľne vykonávať kvalitatívnu i kvantitatívnu mikrobiologickú analýzu. Analýza metód odberu vzoriek z prírodných substrátov ako aj problematika spočívajúcich kvasiniek a kvasinkovitých organizmov rastlinných materiálov dominuje za posledné desaťročia v prácach mnohých autorov [1].

Distribúciu mikroorganizmov v pôde ovplyvňuje veľa faktorov, takže i zastúpenie vínnych kvasiniek v tomto prostredí nemusí byť spravidla nemenné. Pôdna jednotka odberu, zohľadňujúci pôdny typ či rastlinný pokryv, by mala byť homogénna. Takou má byť i vzorka pôdy vinice, ktorá sa odoberá špeciálnym sterilným vrtákom z vrchnej vrstvy pôdy (0,05–0,10 m), kde je najväčšie zastúpenie pôdných kvasiniek. Suspenzia vzorky zeminy sa spracuje napr. Kochovou zriedovacou metódou. Po inkubácii (25 °C, 4–6 dní) sa počet a morfológia vyrastených kolónii hodnotia [2].

Izolácia vínnych kvasiniek z orgánov *Vitis vinifera* L. (jedno- a viacročné drevo, úponky, očka, list, súkvetie, strapina, bobule) poskytuje oveľa bohatší obraz o zastúpení mikrobiologicky i technologicky zaujímavých jedincov. Vzorky častí rastlín sa suspendujú za stáleho miešania niekoľko minút vo vode. Vhodne riedené suspenzie sa kultivujú v glukózovo-peptónovom agare (pH = 4,0) a inkubujú sa pri teplote 20–22 °C po dobu 4–6 dní [3].

Všeobecné zásady pre odber vzoriek zo sekundárnych stanovišť boli vyslovené už dávnejšie [4]. Selektívne prostredie muštu, najmä však vína, zaručuje, že už oveľa nižší

počet reprezentačných vzoriek poskytuje významné výsledky. Navyše vhodná metóda odberu vzorky zabezpečuje v nej minimálne kvalitatívne i kvantitatívne zmeny v zložení mikroorganizmov.

Odber vzoriek z povrchu technologických zariadení, stien a podláh pivníc sa robí odtlačkovou metódou, tzv. Duchoslavovými miskami, stermi vatovým tampónom, či výplachom sterilnou destilovanou vodou. Princípom odtlačkovej metódy je priamy kontakt agarovej živnej pôdy s povrchom vyšetřovaného materiálu. Iným spôsobom sú stery tampónom, ktorý sa po úkone vloží do kvapalného živného média, ktoré možno spracovať bežnými izolačnými metódami [5].

ASPEKTY BIOINŽINIERSKÉJ IZOLÁCIE ČISTEJ KULTÚRY

Izolácia, oddelenie jedného taxonomického druhu zo zmesi mikroorganizmov, je proces, ktorý vedie k zisku populácie čistej kultúry. V laboratórnych podmienkach môžeme na izoláciu čistých kultúr zo zmesi mikroorganizmov využiť napr. zriedovacie metódy (postupné riedenie suspenzie, izolácia viacnásobným rozterom zmesi mikroorganizmov na agare), selektívne médiá, či izoláciu jedinej bunky mikromanipulátorom a jej následnú kultiváciu. Cieľom týchto postupov je, aby kolónie vzniknuté pomnožením vyrástli vždy z jedinej bunky.

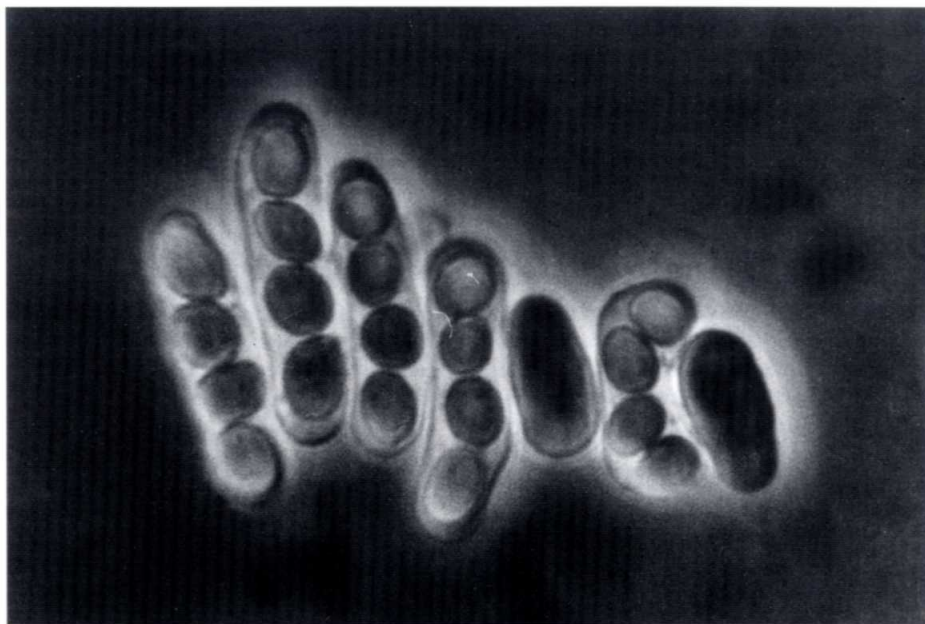
Nasmerovanie izolačnej práce určuje i voľbu pracovných metód. Pri získavaní čistých kultúr vínnych kvasiniek z prírodných stanovišť je napríklad vhodné pomnožiť želané mikroorganizmy za súčasného potlačenia rastu ostatnej mikroflóry vhodne zvolenými podmienkami. Využitie nahromaďovacej techniky zabezpečuje napríklad vytvorenie takého prostredia, ktoré umožní prednostné pomnoženie zvolenej populácie mikroorganizmov. Existuje niekoľko spôsobov nahromaďovacej techniky. Patria sem metódy postupnej inkubácie (selekcia špecifického prostredia, postupné zvyšovanie koncentrácie mikroorganizmov, kontinuálna kultivácia), metódy výberu prostredia, ďalej úprava podmienok kultivácie (pH, teplota, anaerobióza, obohatenie média živinami) a napokon metódy použitia selektívnych inhibítorov (antimetabolity, antibiotiká) [1].

Technika nahromaďovacích kultúr, ktorá využíva kvapalné živné prostredie pri izolácii kvasiniek, má tendenciu skresľovať obraz relatívnych frekvencií distribúcie jednotlivých druhov kvasiniek. V istom zmysle slova je úspech nahromaďovacej techniky založený (okrem iného) i na znalosti poznania rastových rýchlostí vínnych kvasiniek na jednej strane a sprievodných organizmov na strane druhej. Bunky kvasiniek, ktoré sa v zmiešaných populáciách vyskytujú v nízkych koncentráciách, môžu tak nadobudnúť prevahu nad nežiadúcou populáciou mikroorganizmov iba v prípade značne vyšších rastových rýchlostí. Takéto závery sa však týkajú výlučne kultivácie mikroorganizmov v „batch“ podmienkach. Pri aplikácii prietokových systémov, v ktorých možno na základe malých rozdielov rastových rýchlostí doceliť pomnoženie požadovanej čistej kultúry, neplatia.

Jediným spôsobom kultivácie mikroorganizmov v podmienkach ustáleného stavu je využívanie techniky kontinuálnej kultivácie v chemostate. Ak sa zmes kultúr inokuluje do chemostatu, selekciu určuje spôsob, ktorým rastové rýchlosti zložiek populácie závisia od koncentrácie substrátu limitujúceho rast. Táto koncentrácia závisí od aplikovanej zriedovacej rýchlosti. Inokulácia zmesnej populácie v chemostate tak automaticky vedie k čistej kultúre toho organizmu, ktorý vykazuje najvyššiu rastovú rýchlosť pri limitujúcej koncentrácii substrátu [6].

Klasickému chápaniu izolačných postupov sa predsa len takéto metódy práce vymykajú. Ich úspešnosť je však nepopierateľná, vyžaduje si však precízne vyšetrenie rastových kriviek v závislosti od hodnot koncentrácie limitujúceho substrátu [7].

Ak zohľadníme isté špecifiká metód práce vinárskej mikrobiológie, vychádza nám, že pre účely izolácie čistých kultúr vínnych kvasiniek sú výhodnejšie metódy kultivácie na povrchu agaru. Možno je to dané i tým, že bioinžinierske metódy práce nenašli dosiaľ v enológii uplatnenie. Porovnávajúce postupy vylievania a rozotierania na agarové médiá, možno konštatovať, že rozotieranie poskytuje presnejšie údaje [8]. O uplatnení iných izolačných metód (zriedovacie metódy, membránová filtrácia) je v enológii dostatok informácií [9].



Schizosaccharomyces pombe (zv. 2850 \times)

KULTIVÁCIA VÍNNYCH KVASINIEK V SELEKTÍVNOM MÉDIU

Vínne kvasinky kultivujeme na prírodných alebo syntetických kvapalných alebo spevnených živných pôdach. Z prírodných substrátov, ktorých chemické zloženie je nedefinovateľné, možno menovať pivovarnícku sladinu, hroznový mušt či rôzne ovocné šťavy, ktoré možno použiť i na prípravu spevnených pôd (prídavok 1,5–2 % agaru). Umelé komplexné živné médiá sú zložené zo zmesi látok o známom chemickom zložení a upravených prírodných substrátov (glukózovo-peptónový agar, glukózovo-zemiakový agar, Wickerhamova kvapalná pôda, Fowellov acetátový agar...). Glukózovo-peptónový agar je príkladom komplexnej univerzálnej pôdy, na ktorej ras-

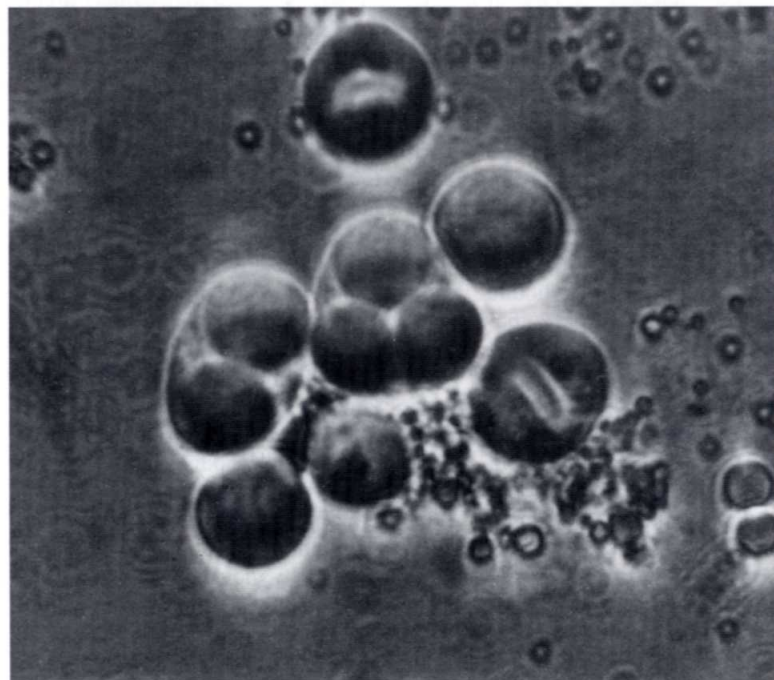
tie veľký počet druhov mikroorganizmov. Od používania takýchto pôd sa i vo vinárskej mikrobiológii upúšťa [10]. Sú nevýhodné v tom, že bránia izolácii kvasiniek, ktoré sú v kvasnom médiu v nižšej koncentrácii. Tak napríklad vo vzorkách muštu, či na počiatku jeho spontánneho kvasenia, keď dominujú druhy *Kloeckera*, *Hanseniaspora* a *Candida*, je obťažné na agarových platniach nájsť zástupcov rodu *Saccharomyces*. Obdobne taketo metódy kultivácie nemôžu poskytovať spoľahlivé údaje o počte nesacharomycetových druhov kvasiniek vo vzorkách dokvášajúcich vín, v ktorých už dominuje *S. cerevisiae*. Aby sa predchádzalo takýmto nepresnostiam, je potrebné používať také kultivačné médiá, ktoré sú schopné zohľadniť rast dominantných i nedo-

minantných druhov vínnych kvasiniek [9].

Na selektívnych kultivačných pôdach rastie iba určitý druh, či určité skupiny mikroorganizmov. Do selektívnych substrátov sa pridávajú také látky, ktoré inhibujú rast nežiaducich mikroorganizmov. Úspešné sú napríklad selekcie kvasiniek a potlačanie rastu baktérií za pomoci antibiotík. Vyrastené kolónie kvasiniek je však potrebné pasážovať na tej istej pôde ešte raz bez antibiotík. Aplikáciu antibiotík pri selektívnej kultivácii kvasiniek je potrebné uprednostniť pred použitím kyslých kultivačných médií, ktoré vedú len čiastočne k úspešnej selekcii kvasiniek. Alkalická reakcia prostredia je na oddelenie kvasiniek od baktérií nevelmi vhodná, avšak nízke pH rast väčšiny baktérií potláča. Čím dlhšie sa dodržiavajú extrémne kyslé hodnoty pH (2,8–4,0), tým je „selektívna“ kultivácia kvasiniek a potlačenie baktérií úspešnejšie. V zmesnej kultúre kvasiniek a vláknitých húb môže byť selektívnym činidlom sodná alebo vápenatá soľ kyseliny propiónovej (0,25 %). Tá však inhibuje nielen vláknité huby, ale i rast niektorých kvasiniek, napr. *Sporobolomyces* sp. Na potlačenie rastu kvasiniek sa zase odporúča aplikovať sorban draselný (500 mg.l⁻¹), na ktorý je väčšina druhov kvasiniek (s výnimkou *Zygosaccharomyces bailii*) citlivá.

Na účely selektívnej izolácie nesacharomycetových druhov kvasiniek (*Kl. apiculata*, *C. stellata*) počas fermentácie hroznového muštu je vhodné používať agar s prídavkom lyzínu. Predominantné *S. cerevisiae* v takomto médiu nerastú, nakoľko nie sú schopné využívať lyzín ako zdroj dusíka [11]. Lyzínový agar pre potreby špecifického monitorovania rastu nesacharomycetových kvasiniek počas kvasenia muštu odporúčajú aj iní autori [12,13]. Kish et al. [14] na účely selektívnej kultivácie a počítanie druhov *Saccharomyces* počas fermentácie navrhujú živné médium obsahujúce 12 % obj. etanolu a 0,015 % disiričitanu sodného. Pitt a Hocking [15] opísali použitie média na selektívnu izoláciu *Zygosaccharomyces bailii*, osmotolerantného druhu, ktorý spôsobuje druhotné kvasenie fľašovaných vín [16]. Na monitorovanie kvasiniek produkujúcich monosulfán možno použiť agar s prídavkom siričitanu bizmutitého, ktorý reaguje s kolóniami produkujúcimi H₂S, ktoré hnednú až čiernejú [17].

V posledných rokoch sa s úspechom aplikuje i selektívna kultivácia zmesnej populácie killerového a senzitivného kmeňa na sladínovom agare (pH = 4,5) s 0,5 M fosfátcitrátovým pufrum. Do 15 ml roztopeného agaru (45 °C) sa suspenduje cca 10⁵ buniek/ml citlivého kmeňa. Po stuhnutí pôdy sa na jej povrchu rozotrie inokulum killerového kmeňa; miska sa inkubuje pri 20 °C po dobu 48 h [18]. Killerové kvasinky inhibujú rast senzitivného kmeňa, čo sa prejaví tvorbou zón potlačeného rastu [19]. Niektoré killerové kmene možno od citlivých kmeňov rozpoznať i na základe odlišných morfológických znakov kolónií na sladínovom agare [20].



Askus Saccharomyces cerevisiae – Fowell (zv. 3000 \times)

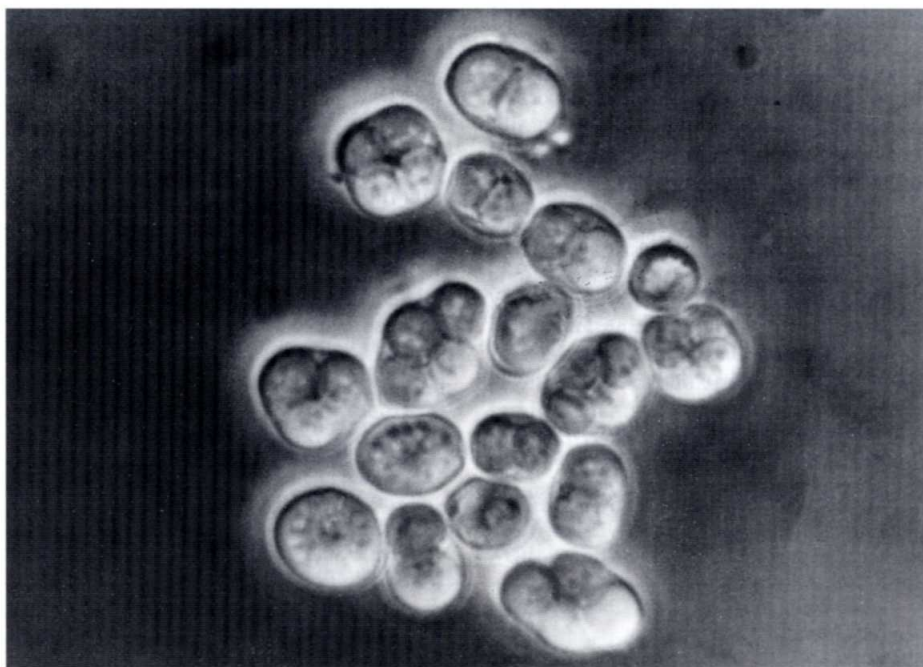
IDENTIFIKÁCIA VÍNNYCH KVASINIEK

Klasifikácia vínnych kvasiniek do rodov a druhov sa organizuje na základe odhaľovania ich morfológických, fyziologických, biochemických, ako aj genetických vlastností [2, 21, 22]. Identifikujú sa po vyhodnotení testov sledovaním a porovnávaním klasifikačných schém a kľúčov osvedčených autorov [23, 24, 25]. Identifikačných testov býva veľa, spravidla sa však na klasickú i numerickú taxonómiu využíva šesť desiatok skúšok (jednou z najdôležitejších je oxidatívna utilizácia rôznych uhlíkatých zdrojov). Existuje rad kritických štúdií o niektorých z týchto testov [26]. Presná interpretácia získaných údajov vyžaduje ďalšie práce, ktoré sú komplikované mnohými zmenami pôvodných, druhových či rodových označení kvasiniek. Mnohé z týchto zmien vznikli ako dôsledok využitia výsledkov novších molekulárnych výskumov v taxonómii, ako aj snáh mnohých taxonómov opísať čo najvernejším spôsobom fylogenetickú klasifikáciu [27].

Zmeny v pomenovaní vínnych kvasiniek spôsobujú v posledných rokoch v obci praktických vinárov isté rozčarovanie. Zaužívané názvy známych a taxonomicky príbuzných druhov *S. bayanus*, *S. capensis* či *S. chevalieri* sú dnes neplatné, pretože všetky sú opísané v rámci jediného druhu *S. cerevisiae*. Reklasifikačné zmeny možno ilustrovať i na prípade *S. bailii* vs. *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomyces rosei* vs. *Torulaspora delbrueckii*, či *Torulopsis stellata* vs. *Candida stellata* [23]. Diskusia a polemiky okolo nomenklatúry kvasiniek sú navyše živene rozdielnymi filozofickými prístupmi autorov [28].

Klasické postupy identifikácie sú často i metodicky náročné. Nové identifikačné schémy sú založené na využívaní výsledkov 15–25 starostlivo vybraných kľúčových testov a na aplikácii miniaturizovaných komerčných diagnostických kitov [29]. Tieto testy, hodnotiace rast kvasiniek v prítomnosti niektorých uhlíkatých i dusíkatých látok, poskytujú pri interpretácii získaných údajov počítačom výsledky do 48 hodín. Systém API 20C sa napríklad ukázal ako vhodný pre potreby identifikácie vínnych kvasiniek [30]. Na strane druhej systémy API 50CH [31] a API ATB 32C [32] sa pre identifikáciu vínnych kvasiniek ukázali ako nevhodné. Spôhlivosť týchto postupov, opísaných najmä pre potreby identifikácie kvasiniek spôsobujúcich mikrobiálne znehodnocovanie potravín, si v prípade vínnych kvasiniek vyžaduje hlbšiu verifikáciu [33].

Pre spoľahlivú identifikáciu vínnych kvasiniek je potrebné výsledky testov nových systémov doplniť o „klasické“ fermentačné a asimilačné skúšky, ako aj zistenie požiadaviek na vitamíny či sporulačné testy [34]. Zaradením počítačového programu navyše možno získať veľmi vhodný a rýchly systém pre identifikáciu vínnych kvasiniek [9].

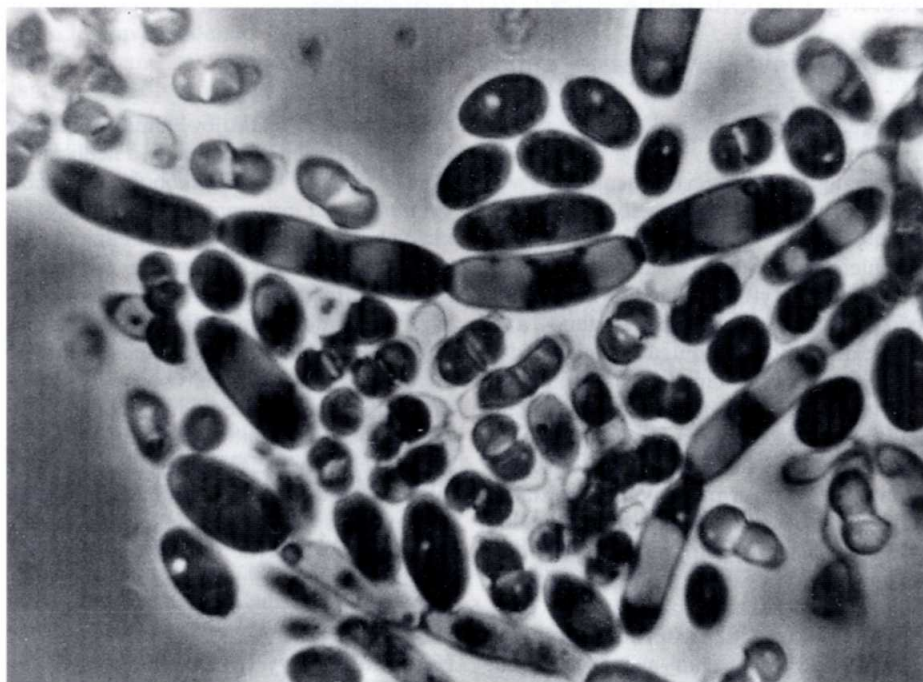


Saccharomyces cerevisiae – vegetatívne bunky a asky s askospórmi (zv. 2250×)

Záverom niekoľko poznámok k druhovej identifikácii. Niet pochyb o tom, že druh *Saccharomyces cerevisiae* je nezastupiteľne a významne projektantom i stavbárom hroznového vína [35,36]. „Pomocné práce“ nesaccharomycetových druhov však istou, i keď nerovnakou mierou, prispievajú do jeho konštrukcie. Schopnosť diferencovať druhy vínnych kvasiniek je tak ultimátnou požiadavkou enologickej moderny. Konvenčné identifikačné schémy majú však pomerne nízku „druhovu“ rozlišovaciu schopnosť. Vývoj molekulárnych technológií zasiahol v posledných rokoch i túto oblasť [37, 38]. Diferenciáciu kmeňov vínnych kvasiniek umožňuje napríklad spoznanie elektroforetických profilov extracelulárnych

i intracelulárnych proteínov alebo enzýmov [39]. Klasifikácia profilujúcich proteínov a mastných kyselín si však žiada zvýšenú laboratórno-metodickú opatrnosť, nakoľko zloženie bielkovín a lipidov kvasiniek sa mení s podmienkami kultivácie a zmenou fyziologického stavu bunky [40].

Identifikácii a charakterizácii kvasinkového kmeňa môže poslúžiť i analýza reštrikcie DNA [41]. Použitie reštrikčných endonukleáz, ktoré fragmentujú chromozomálnu alebo mitochondriálnu DNA na segmenty, umožňuje charakterizovať „fingerpint“ kmeňa [42]. Elektroforetické profily chromozómov druhu *S. cerevisiae* sú tak reprodukovateľným znakom jeho opisu [43, 44].



Pichia membranifaciens FK (zv. 2500×)

LITERATÚRA

- [1] MINÁRIK, E.: Získavanie nových kmeňov z prírodných stanovišť. In: Kvasinky ve výzkumu a praxi. Ed. D. Vraná. Akademie, Praha, 1986, s. 46
- [2] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov. Alfa, Bratislava, 1990, s. 48
- [3] MINÁRIK, E., NAVARA, A.: Chémia a mikrobiológia vína. Príroda, Bratislava, 1986, s. 494
- [4] KUNKEE, R.E., AMERINE, M.A.: Yeasts in wine-making. In: The Yeasts. Eds. A. H. Rose, J. S. Harrison. Academic Press, London, New York, 1970.
- [5] VOLLEK, V.: Mikrobiologické praktikum. ES SVŠT, Bratislava, 1979.
- [6] AIBA, Sh., HUMPHREY, A.E., MILLIS, N.F.: Biochemical Engineering. Academic Press, New York, 1965, s. 107
- [7] MALÍK, F.: Čisté kultúry vínnych kvasiniek v stratégii enologickej moderny. Doktorská dizertačná práca. ČHTF STU Bratislava, 1997.
- [8] KING, A.P., et al.: Methods for the mycological examination of food. Plenum Press, New York, 1986.
- [9] FLEET, G. H.: The microorganisms of winemaking – isolation, enumeration and identification. In: Wine microbiology and biotechnology. Ed. G.H. Fleet. Hardwood Publishers Chur, 1993.
- [10] MORA, J., MULET, A.: Am. J. Enol. Viticult. **42**, 1991, s. 133
- [11] HEARD, G.M., FLEET, G.H.: J. Appl. Bact. **60**, 1986, s. 477
- [12] MOORE, K.J., JOHNSON, M.G., MORRIS, J.R.: J. Food Sc. **53**, 1988, s.1725
- [13] MORA, J., BARBAS, J.J., MULET, A. 1990: Am. J. Enol. Viticult. **141**, 1990, s. 156
- [14] KISH, S., SHARF, R., MARGALITH, P.: J. Appl. Bact. **55**, 1983, s. 177
- [15] J.J., HOCKING, A. D.: Fungi and Food Spoilage. Academic Press, Sydney, 1989.
- [16] DITTRICH, H. H.: Mikrobiologie des Weines. Verlag E. Ulmer, Stuttgart, 1987.
- [17] MARTINEZ, J., MILLÁN, C., ORTEGA, J. M.: S. Afr. J. Enol. Viticult. **10**, 1989, s. 31
- [18] YOUNG, T.W.: Killer yeasts. In: The Yeasts. Vol. 2. Yeasts and the Environment. Eds. A.H. Rose, J.S. Harrison. Academic Press, London, 1987, s. 131
- [19] MICHALČÁKOVÁ, S., MALÍK, F.: Vinohrad **29**, 1991, s. 154
- [20] JACOBS, C.J., VAN VUUREN, H.J.J.: Am. J. Enol. Viticult. **42**, 1991, s. 295
- [21] KREGER-VAN RIJ, N.: Classification of yeasts. In: The Yeasts, Vol. 1. Ed. A.H. Rose and J.S. Harrison, Academic Press, London, 1987.
- [22] KURTZMAN, C.P., 1990: Classification and general properties of yeasts. In: Yeasts Biotechnology and Biocatalysis. Eds. H. Vrachtert and R. DeMot. Marcel Dekker, New York, 1990, s. 1
- [23] KREGER-VAN RIJ, N.: The Yeasts, a Taxonomic Study. Elsevier, Amsterdam, 1984.
- [24] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Identifikačné testy a skríningy. In: Kvasinky ve výzkumu a praxi. Ed. D. Vraná. Akademie, Praha, 1986, s. 305
- [25] BARNETT, J.A., PAYNE, R.W., YARROW, D.: Yeasts, Characteristics and Identification. Cambridge University Press, Cambridge, 1990.
- [26] LIN, C.C.S., FUNG, D.Y. 1987: Crit. Rev. Microbiol. **14**, 1987, s. 273
- [27] KURTZMAN, C.P., PHAFF, H.J.: Molecular taxonomy. In: The Yeasts. Ed. A.H. Rose, J.S. Harrison. Academic Press, London, 1987, s. 63
- [28] MARTINI, A., MARTINI, A.V.: Grape must fermentation: past and present. In: Yeast Technology. Eds. J.F.T. Spencer, B.M. Spencer. Springer Verlag, Berlin, 1990, s. 105
- [29] DEÁK, Z., BEUCHAT, L.R. : J. Food Prot. **50**, 1987, s. 243
- [30] SUBDEN, R.E., CORNELL, R., NOBLE, A.C.: Am. J. Enol. Viticult. **31**, 1980, s. 364
- [31] ISON, R.W., 1987: Lett. Appl. Microbiol. **4**, 1987, s. 9
- [32] ROHM, H., LECHNER, F., LECHNER, M.: Int. J. Food Microbiol. **11**, 1990, s. 215
- [33] ROHM, H., LECHNER, F.: yeasts. Appl. Environ. Microbiol. **56**, 1990, s. 1290
- [34] HEARD, G.M., FLEET, G.H.: J. Appl. Bact. **68**, 1990, s. 447
- [35] MINÁRIK, E.: Štúdium ekológie vínnych kvasiniek a kvasinkových organizmov prírodných a druhotných stanovišť. Doktorská dizertačná práca. KVÚVV, Bratislava, 1978.
- [36] THORNTON, R.J., BUNKER, A.: J. Inst. Brew. **95**, 1989, s. 181
- [37] DEGRÉ, R., et al.: Am. J. Enol. Viticult. **40**, 1989, s. 309
- [38] GANGL, H.: Der Einfluss von molekularbiologisch definierten Hefen auf das Gärverhalten eines Welschrieslingmostes und die analytischen und sensorischen Merkmale des resultierenden Weines. In: 11. Internationale nologisches Symposium, Sopron, 1996, s. 55.
- [39] LAVALLÉE, F., THOMAS, D., DEGRÉ, R.: Computerized wine yeast strain identification. Proceeding of the American Society of Enology and Viticulture. Los Angeles, 1990, s. 7
- [40] ŠAJBIDOR, J., GREGO, J.: Microbiol. Lett. **93**, 1992, s. 13.
- [41] QUEROL, A., et al.: J. Food Sc. **57**, 1992, s. 183
- [42] MEADEN, P.J.: J. Inst. Brew. **96**, 1990, s.195
- [43] BLONDIN, B., VÉZINHET, F.: Rev. Fran. Oenol. **29**, 1988, s. 7
- [44] PETERING, J., LANGRIDGE, P., HENSCHKE, P.: Austr. N. Zeal. Wine Ind. **3**, 1988, s. 48

foto: V. Vollek
Lektorovala: *prof.ing. Kateřina*
Demnerová, ČSc.
Do redakce došlo 1. 12. 1998