

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

**VYUŽITIE TECHNICKEJ MIKROBIOLÓGIE V
KVASNOM A POTRAVINÁRSKOM PRIEMYSE**



**Slavomír ČERŇANSKÝ
Miloslav KHUN**

BRATISLAVA 2011

Vydanie tejto publikácie podporili granty Kultúrnej a edukačnej grantovej agentúry MŠVVaŠ SR č. 3/7234/09 s názvom "Informačné technológie ako nástroj vzdelávania v oblasti hodnotenia environmentálnych a ekologických rizík a ozdravovania životného prostredia" a Vedeckej grantovej agentúry MŠVVaŠ a SAV č. 1/0492/11 s názvom "Retenčné a degradačné charakteristiky vybraných herbicídov v poľnohospodárskych pôdach Žitného ostrova".

Obrázok na titulnej strane: www.infobarrel.com

Využitie technickej mikrobiológie v kvasnom a potravinárskom priemysle

© Mgr. Slavomír Čerňanský, PhD., doc. RNDr. Miloslav Khun, CSc.

Recenzenti:

prof. Ing. Peter Fečko, CSc.

Mgr. Hana Vojtková, PhD.

Vydala: Univerzita Komenského v Bratislave

1. vydanie, 2011

Náklad: 300 ks

Za odbornú a jazykovú stránku publikácie zodpovedajú autori.

Všetky práva vyhradené. Táto kniha ani jej časti nesmú byť žiadnym spôsobom reprodukované, ukladané alebo rozširované bez písomného súhlasu autorov.

ISBN: 978-80-223-3135-7

OBSAH

1. Úvod	6
2. Mikroorganizmy pri výrobe liehu a destilátov	8
2.1 Kvasinky	8
2.1.1 Stavba kvasinky	18
2.1.2 Chemické zloženie buniek kvasiniek	20
2.1.3 Metabolizmus kvasiniek	22
2.2 Kontaminujúce baktérie a ďalšie škodlivé mikroorganizmy v lieho- varníckej prevádzke a ochrana proti nim	23
2.2.1 Mliečne baktérie	23
2.2.2 Octové baktérie	24
2.2.3 Baktérie maslového a propiónového kvasenia	24
2.2.4 Hnilobné baktérie	24
2.2.5 Baktérie pektínového kvasenia	25
2.2.6 Butanolové baktérie	25
2.2.7 Mikroskopické vláknité huby	25
2.2.8 Iné kontaminujúce baktérie	26
3. Liehové kvasenie	30
3.1 Základné podmienky pre liehové kvasenie	36
3.2 Enzymológia liehového kvasenia	37
3.3 Vlastný mechanizmus liehového kvasenia	41
3.4 Vedľajšie produkty liehového kvasenia	44
3.5 Výťažnosť etanolu a vedľajších produktov pri liehovom kvasení	46
4. Princípy fermentačných technológií	47
4.1 Destilácia, rektifikácia a rafinácia	55
5. Výroba liehu	63
5.1 Suroviny pri výrobe liehu	63
5.2 Výroba liehu zo škrobnatých surovín	65
5.3 Výroba liehu zo surovín obsahujúcich jednoduché cukry	67
5.4 Destilácia	69
6. Výroba liehovín a destilátov	72

6.1 Suroviny na výrobu liehovín	73
6.2 Technológia kvasenia	74
6.3 Výroba niektorých druhov páleniek	82
6.3.1 Slivovica	83
6.3.2 Jablčkovica a hruškovica	85
6.3.3 Destiláty z vína a hrozna	86
6.3.4 Whisky	82
7. Výroba piva	100
7.1 Suroviny na výrobu piva	100
7.1.1 Pivovarský slad	101
7.1.2 Chmeľ a chmeľové výrobky	105
7.1.3 Voda	108
7.1.4 Pomocné suroviny	109
7.2 Príprava mladiny	110
7.3 Pivovarské kvasinky	115
7.4 Mikrobiológia výroby piva	125
7.5 Kvasenie mladiny, dokvasovanie a zrenie piva	131
7.6 Druhy pív	135
7.7 Pivo a zdravie človeka	140
8. Výroba vína	142
8.1 Zber a spracovanie hrozna	142
8.1.1 Vybrané odrody viniča	145
8.2 Získavanie a úprava muštu	155
8.2.1 Zloženie muštu	159
8.3 Alkoholové kvasenie	160
8.4 Jablčno-mliečna fermentácia	163
8.4 Biologické odbúravanie kyselín	168
8.5 Mikrobiológia vína	170
8.5.1 Kvasinky	171
8.5.2 Baktérie mliečneho kvasenia	181
8.5.3 Baktérie octového kvasenia	185

8.5.4 Mikroskopické vláknité huby	186
8.5.5 Ostatné mikroorganizmy	192
8.6 Zloženie vína	195
8.7 Príprava červeného vína a zrenie vína v barikových sudoch	198
8.8 Klasifikácia vín a slovenská legislatíva	200
8.9 Ošetrovanie a stabilizácia vína	203
8.10 Čistenie vína	204
8.11 Chyby a choroby vína	206
8.12 Perlivé a šumivé víno	211
8.13 Aromatizované a likérové víno	212
9. Výroba syrov	214
9.1 Mikrobiológia syrov	215
9.2 Klasifikácia syrov a charakteristika vybraných druhov syrov	226
Použitá literatúra	240
Register	247

1. ÚVOD

Ľudia bežne vedia, že mikroorganizmy negatívne pôsobia na potraviny – spôsobujú ich kazenie a tým ich nevratné znehodnotenie. Menej je však v ľudskom povedomí veľmi pozitívna vlastnosť niektorých mikroorganizmov, a to skutočnosť, že sa uplatňujú pri výrobe rôznych potravín ako aj pri ovplyvňovaní niektorých telesných funkcií (napríklad pri zažívacích pochodoch). Účinkom mikroorganizmov získavajú fermentované potraviny požadované chuťové i technologické vlastnosti. V súčasnosti existuje vo svete viac než 3 500 tradičných fermentovaných potravín. Možno spomenúť napr. chlieb, jogurty či syry bežné v Európe a Severnej Amerike, kým potraviny v Afrike, ktoré sa pripravujú z fermentovaných škrobnatých plodín (napr. kassava) sú základom miestnych pokrmov. V Ázii sú zase denne konzumované výrobky pripravované na báze fermentovaných sójových bôbov alebo rýb. Fermentované nápoje zahŕňujú nielen alkoholické nápoje ako je pivo, víno či liehoviny, ale aj čaj, kávu a kakao, kde sú listy alebo bôby po zbere podrobené fermentácii za účelom dosiahnutia charakteristických chutí a vôní. Taktiež je možné niektoré potraviny fermentačne upraviť tak, že sú výživnejšie, stráviteľnejšie a v neposlednom rade i chutnejšie.

Najznámejšími mikroorganizmami na výrobu potravín a nápojov sú bezpochyby kvasinky. Stretáme sa s nimi pri výrobe chleba a pečiva, kde majú hlavnú úlohu pri zabezpečení požadovanej hubovitej štruktúry a pri tvorbe alkoholu, ktorý vzniká premenou cukru liehovým kvasením. O význame kvasiniek v priemyselnej výrobe potravín napr. svedčí inicializácia veľkého medzinárodného projektu Yeast Genome Project, na ktorom spolupracuje viac než 600 vedcov z 9 pracovísk z rôznych štátov. Jedným z výsledkov tohto výskumu je stanovenie kompletnej génovej sekvencie kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v roku 1997. Druhým najdôležitejším zameraním fermentačného priemyslu (po výrobe alkoholických nápojov) je výroba kyslomliečnych produktov, nie je objektom tejto kapitoly.

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* sa pre svoju ľahkú dostupnosť stala vedeckým modelom – slúži ako model bunky v cytológii, genetike, biochémií i makromolekulovej biológii. Kvasinky sú výhodné pre svoju veľkú výkonnosť, rýchlo rastú a manipulácia s nimi je jednoduchá a sú klasifikované ako všeobecne bezpečné (GRAS – generally

recognized as safe). Kvasinkové modely sa využívajú aj pri štúdiu geneticky podmienených chorôb u človeka, pretože poskytujú výskumníkom jednoduchý systém, ktorý umožňuje objasniť ako gény fungujú.

2. Mikroorganizmy pri výrobe liehu a destilátov

Proces, pri ktorom sa cukry pôsobením mikroorganizmov premieňajú štiepením na etylalkohol, sa nazýva liehovým kvasením. Etylalkohol môžu vytvárať rôzne mikroorganizmy pomocou zložitého biochemického systému – systému enzýmov, ktorý si vytvárajú v živom tele ako nedeliteľnú súčasť svojej životnej činnosti. Pri liehovom kvasení cukrov sa používajú vo všeobecnosti len kvasinky, a to nielen preto, aby sa získali produkty nielen vysokej čistoty, ale aj maximálne výťažky. V liehovaroch a pri výrobe ovocného liehu sa ku kvaseniu používa určitý druh kvasiniek, ktorý je prispôsobený na spracúvaný substrát. Táto čistá kultúra sa rozmnožuje určitým spôsobom (propagačné stanice, statické alebo prúdiace živné prostredie) za dodržania všetkých podmienok sterility. Rozmnožená kultúra sa potom vo forme zákvasu určitého objemu s potrebným množstvom kvasiniek použije k hlavnému kvaseniu.

Na druhej strane sa v menších páleniciach nepoužíva ku kvaseniu čistých kultúr kvasiniek určitého druhu, ale pracuje sa s mikroorganizmami, ktoré si ovocie prináša so sebou. Na povrch ovocia sú mikroorganizmy zanášané vetrom, dažďom, hmyzom a vtákmi. Na zdravo ovocí sa potom tieto mikroorganizmy uchytia na šupke bez toho, aby sa ďalej rozmnožovali. Ak je ovocie poškodené, vnikajú mikroorganizmy do dužiny, ktorá sa stáva pre ne zdrojom výživy a umožňuje ich rozmnožovanie. Samozrejme, že v tejto mikroflóre uchytenej na ovocí, sú prítomné najrôznejšie mikroorganizmy ako napr. kvasinky, baktérie či plesne, a to v rôznom zastúpení. Najpočetnejšie bývajú však kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy.

Podľa druhu činnosti možno mikroorganizmy rozdeliť na:

- 1) produkčné, t. j. tie, ktoré sa aktívne zúčastňujú na tvorbe etylalkoholu, prípadne iných vedľajších produktov,
- 2) škodlivé - kontaminujúce, teda také, ktorých prítomnosť je nežiaduca, pretože majú nepriaznivý vplyv na kvasný proces a teda i na kvalitu produktu a jeho výťažnosť.

Je potrebné uviesť, že početnými pokusmi so zavádzaním čistých kultúr kvasiniek vo výrobe destilátov sa preukázalo, že nie je presná hranica medzi produkčnými a kontaminujúcimi mikroorganizmami (najmä u kvasiniek) hlavne preto, že niektoré z týchto sprievodných mikroorganizmov sa často zúčastňujú na tvorbe buketných a chuťových látok, dôležitých pre kvalitu destilátu. Použitie čistých zákvasov má tú výhodu, že sa podstatne skrátí doba kvasenia a umožňuje lepšie riadenia kvasného procesu a dosiahnutie vyšších výťažností.

2.1 Kvasinky

Pozrime sa najprv do rannej histórie objavenia a výskumu kvasiniek. Objavenie mikroorganizmov bolo paralelné s vynájdением a zdokonaľovaním mikroskopu. Tak napríklad Athanasius Kircher v roku 1658 oznámil, že pod mikroskopom v hniúcom mäse videl malé žijúce červy – zväčšenie jeho mikroskopu bolo tak malé, že nemohol vidieť mikroorganizmy. V roku 1664 Robert Hooke vďaka mikroskopu opísal štruktúru plesní. Ale bezpochyby prvým, kto pod mikroskopom uvidel mikroorganizmy, najmä baktérie a kvasinky bol Holanďan Anton van Leeuwenhoek. Tento obchodník a vedec

z Delft v Holandsku je známy ako „otec mikrobiológie“ a svoje pozorovania robil na vlastnoručne vyrobených mikroskopoch. Za svojho života ich vyrobil viac než 400 rozdielnych typov (9 sa zachovalo dodnes) a vybrúsil vyše 500 optických šošoviek. Tie, ktoré sa zachovali, sú schopné až 270-násobného zväčšenia, predpokladá sa však, že vyrobil aj mikroskopy, ktoré mohli zväčšovať viac ako 500-krát. O výsledkoch pozorovaní Leeuwenhoeka vedeli spočiatku len jeho priatelia až kým ich nepredložil Kráľovskej spoločnosti jeho priateľ, slávny anatóm Reinier de Graaf v roku 1673 (pozn.: Kráľovská spoločnosť – Royal Society for The Improvement of Natural Knowledge – je britská učená spoločnosť čiže akadémia pre podporu vied založená v roku 1660 v Londýne, v roku 1662 ju potvrdil kráľ Karol II. Leeuwenhoek bol za jej člena zvolený ako 48-ročný v roku 1680). Leeuwenhoek o svojich pozorovaniach písal Kráľovskej spoločnosti vo forme listov (za svojho života ich napísal okolo 200), väčšina bola publikovaná v *Philosophical Transactions of Royal Society*. O tom, kedy Leeuwenhoek prvýkrát opísal kvasinky je viacero rozdielnych údajov (1674, 1676), avšak v roku 1680 poznamenal, že kvasinky sa skladajú z malých globulárnych častíc. Možno poznamenať, že Leeuwenhoekov objav všeobecnej existencie mikroorganizmov (najmä baktérií a kvasiniek) okolo roku 1670 spôsobil, že sa začala spájať ich možná úloha s kazením potravín, fermentáciou a chorobami z potravín – teda akýsi prvotný počiatok potravinárskej mikrobiológie.

Hoci pivovarníci vedeli, že kvasinky sú základom pre kvasenie, nevedeli jeho mechanizmus a ani nemali bližšie poznatky o týchto kvasinkách. Napríklad londýnsky pivovarník Michael Combrune, ktorý bol medzi prvými čo používali teplomer, v roku 1762 napísal, že kvasinky boli „pľuzgieriky tvorené z mladiny a naplnené elastickým vzduchom“. Začiatkom roku 1830 veda pokročila a zistilo sa, že kvasinky produkujú etanol z cukru a CO₂ ako vedľajší produkt, ale ako to kvasinky robia, či dokonca to, že sú živé organizmy bolo úplne neznáme.

Zdokonalenie mikroskopu (Giovanni Amici v roku 1820 - jeden z jeho mikroskopov vyrobených v roku 1837 mal rozlíšenie okolo 1 μm) umožnilo trom vedcom nezávisle od seba pracovať na odpovedi na otázku, ktorú položil Francúzsky inštitút (*Institut de France*) v roku 1803 – odpoveď bola dotovaná medailou v hodnote jedného kilogramu zlata. (Pozn.: pretože nebola dodaná uspokojujúca odpoveď, cena bola ponúknutá ešte raz v roku 1805, no neskôršie stiahnutá z prozaického dôvodu – inštitút nebol solventný). Otázka znela: „Aké sú charakteristiky, ktoré rozlišujú rastlinné a živočíšne substancie pôsobiace ako ferment od tých, ktoré fermentácii podliehajú?“ Títo traja boli Charles Cagniard de la Tour (publikoval pod menom Cagniard-Latour), prírodovedec a inžinier z Paríža, Friedrich Traugott Kützing, algológ z Halle a Theodor Ambrose Hubert Schwann, známy fyziológ z Berlína. Cagniard-Latour skúmal pivovarnícke a vinárske kvasinky, ktoré opísal ako zložené z globúl a predpokladal, že patria do rastlinnej ríše, pretože nie sú pohyblivé. Dokonca opísal vonkajšie charakteristiky buniek ako sú jazvy po púčkoch, ktoré vznikajú na stene bunky po oddelení dcérskej bunky, ktoré pozoroval pod Amiciho mikroskopom so zväčšením až 500x. Tento opis bol ignorovaný až do roku 1950, kedy ich znovu objavil A. A. Barton. Cagniard-Latour v roku 1836 ako prvý publikoval dobré dôkazy, že kvasinky sú živé organizmy („...pretože sa sami reprodukovujú, sú živé ...“). Urobil pozoruhodné presné meranie priemeru bunky kvasiniek – okolo 7 μm. Pri sumarizácii svojich objavov v roku 1837 napísal, že pivovarské kvasinky sú časťou rastlinnej ríše a nie ako bolo dovtedy predpokladané, že ide o inertnú alebo čistú chemickú substanciu. Tieto kvasinky

rozkladali cukor len keď boli živé, uvoľňujúc CO₂ z tohto rozkladu a premieňali cukor na alkoholickú tekutinu.

Druhý z týchto pionierov, F. Kützig, publikoval v tom istom roku (1837) jasný opis a obrázky buniek kvasiniek, ktoré videl pod mikroskopom od F. W. Schieka z Berlína so 420-násobným zväčšením. Podobne ako Cagniard-Latour zmeral priemer buniek kvasiniek v rozsahu 6-9 μm. Jeho predpoklad, že rôzne druhy fermentácie, ako napr. octové kvasenie, je v dôsledku rozličných organizmov bolo potvrdené o štvrté storočia neskôr Louisom Pasteurom.

Najznámejší z týchto troch, Theodor Schwann rozvinul „teóriu bunky“, najmä to, že živé štruktúry pochádzajú z tvorby a oddeľovania jednotiek (buniek), ktoré potom tvoria telá organizmov. Schwann vo svojej významnej publikácii z roku 1837 predpokladal fakty, ktoré potom o viac ako 20 rokov neskôr tiež potvrdil Pasteur. Napísal: „Na liehové kvasenie sa musí nazeráť ako na rozklad ovplyvnený cukornatými hubami, ktoré extrahujú z cukru a dusíkatej substancie materiály potrebné pre ich výživu a rast; substancie, ktoré neboli zachytené rastlinami tvoria alkohol“. Týmto vlastne dal kvasinkám meno – cukornatá huba – Zuckerpilz v nemeckom origináli alebo v angličtine sugar fungus.



Obr. 1 Podobizeň Theodora Schwanna

Schwannovi pri jeho práci poskytoval konzultácie nemecký botanik-mykológ a lekár Franz Julius Ferdinand Meyen, ktorý súhlasil s jeho závermi. O rok neskôr Meyen preložil tento názov do latinčiny a tak dostali kvasinky rodové meno *Saccharomyces*

(pozn.: v modernej latinčine *Saccharomyces* je zložené z gréckych slov *saccharos* = cukor a *myces* alebo *mukes* = huba). Teda v roku 1838 Meyen zaviedol rod *Saccharomyces*, ktorý zahŕňal tri druhy *S. cerevisiae*, *S. pomorum* a *S. vini* s druhovými názvami, ktoré jednoducho indikovali, kde boli nájdené – pri kvasení piva (*cerevisiae* pochádza z galského názvu pre pivo *kerevigia* alebo staro-francúzskeho *cervoise*, resp. latinského latinského prekladu), jablčného muštu a vína. Mayen spojil rodové meno s druhovým názvom podľa pravidiel, ktoré zaviedol Carl von Linné pre rastliny a živočíšnu ríšu.

Objavy týchto troch pionierov mikrobiológie temer okamžite potvrdili v roku 1838 dvaja Francúzi – T. A. Quevenne a P. J. F. Turpin. Quevenne nepochybne prehlásil, že kvasinky odobraté z kvasiacej pivnej mladiny sú sami o sebe vysoko fermentatívne a jasne popísal mikroskopický výskyt globúl kvasiniek ako aj tvorbu jaziev. Turpin nielenže sa pridal k týmto Quevenneovým potvrdeniam objavov Cagniard-Latoura, Kütziga a Schwanna ale o dva roky neskôr (1840) publikoval excelentné a detailné obrázky pivovarských kvasiniek.

Na druhej strane ale bezprostredne nasledovalo odmietnutie tohto konceptu kvasiniek ako živých organizmov tromi význačnými a vplyvnými chemikmi tej doby: Jöns Berzelius, Justus von Liebig a Friedrich Wöhler, ktorí považovali kvasinky za fyzikálno-chemický fenomén. To bola pozoruhodná udalosť v histórii vedy a pravdepodobne zdržala vývoj mikrobiológie cca o 20 rokov. Dokonca von Liebig a Wöhler zašli tak ďaleko, že publikovali spoločne vo svojom časopise *Annalen der Pharmacie* zosmiešňujúcu karikatúru nazvanú „Záhada alkoholického kvasenia vyriešená“ znázorňujúcu kvasinky pod mikroskopom ako malé zvieratká požierajúce cukor a vylučujúce alkohol z análneho otvoru a CO₂ z genitálií. Napriek tomu, že viacerí významní vedci tej doby sa pripojili k Liebigovmu pohľadu, že kvasinky nie sú živé organizmy, boli na druhej strane významní vedci s opačným názorom. K týmto patrili napr. známy chemik Eilhard Mitscherlich alebo význačný polyhistor barón Ferdinand von Helmholtz či ďalší, ktorí akceptovali objavy vyššie spomínaných priekopníkov mikrobiológie ako J. E. Schlossberger, J. Quekett a C. J. N. Balling.

V rozpätí rokov 1850 až 1880 kvasinky sa stali všeobecne považované za mikróby. Boli opísané rôzne druhy kvasiniek podobne ako baktérie, začala sa študovať ich fyziológia. V tej dobe vedci ovplyvnení prístupom Liebiga a Berzeliusa boli v konflikte s biológmi, ktorí nasledovali Schwanna. Chemici interpretovali zmeny produkované mikróbmami v intenciách katalýzy. Tým pomohli nechtiac k objavu enzymológie. Biológovia na druhej strane robili pokroky v mikrobiológii, najmä mikrobiálnej fyziológii. Akceptáciou kvasiniek ako živých organizmov, ktoré spôsobujú kvasenie, sa väčšina sporov posunula k inej otázke – môže byť kvasenie a ďalšie podobné zmeny prisúdené vnútrobunkovým aktivitám mikróbov alebo k pôsobeniu extracelulárnych enzýmov? V týchto sporoch hrali veľkú úlohu dvaja francúzski vedci: Louis Pasteur (1822-1895) a Pierre Berthelot (1827-1907). Pasteur po počiatkových úspechoch ako výskumný chemik sa následne stal najvýznačnejším mikrobiológom všetkých čias. Berthelot bol vynikajúci chemik, ktorý veľkou mierou prispel k syntetickej organickej chémii. Pasteur začal pracovať na fermentácii cukru kvasinkami v druhej polovici päťdesiatych rokov 19. storočia. Medzi rokmi 1855 až 1875 jednoznačne stanovil a) úlohu kvasiniek v alkoholickom kvasení, b) kvasenie ako fyziologický fenomén a c) rozdiely medzi aeróbnym a anaeróbnym využitím cukru kvasinkami. Zaviedol termíny „anaeróbný a aeróbný“. Berthelot

publikoval práce o premene sacharózy (cukru z cukrovej trstiny) na etanol pivovarskými kvasinkami.



Obr. 2 Louis Pasteur v roku 1857



Obr. 3 Pierre Berthelot

Rod *Saccharomyces* definoval však až v roku 1870 nemecký botanik Max Ferdinand Friedrich Reess, profesor botaniky na Univerzite v Erlangene (monografia *Botanische Untersuchungen über die Alkoholgärungspilze*, Lipsko 1870). Preto by sa mal tento rod botanicky správne písať *Saccharmyces* (Meyen) Reess. Kým Mayen použil názov *Saccharomyces cerevisiae* pre pivovarskú kvasinku a rozlišoval ju od kvasiniek, ktoré skvasovali ovocné mušty (*S. pomorum* a *S. vini*), Reess rozlišoval pivovarnícke kvasinky *S. cerevesiae* a vínne kvasinky *S. elipsoideus*. Reess označil *Saccharomyces* ako askomycéty, aská boli materské bunky a askospóry dcérske bunky a nazýval ich (ako aj ďalšie kvasinky) ako askosporogénne kvasinky. Rozdiel medzi nimi spresnil až Emil Christian Hansen, dánsky mikrobiológ, ktorý pracoval v laboratóriu kodanského pivovaru Carlsberg v rokoch 1883 až 1888 (v spomínanom pivovare pracoval od roku 1877). Zaviedol ich fyziologickú charakteristiku. V roku 1883 vyvinul efektívnu techniku na získanie čistých kvasinkových kultúr. Rozlíšil v pivovarníctve kvasinky vrchného kvasenia, ktoré pomenoval *Saccharomyces cerevisiae* od kvasiniek spodného kvasenia *Saccharomyces pastorianus*, ktoré pomenoval na počesť Pasteura. V roku 1895 publikoval prvý praktický návrh taxonómie kvasiniek. Koncom 19. storočia referoval o publikovaných druhoch, z ktorých identita asi 90 je dodnes známa, ich počty za dekády tohto storočia sú uvedené v tab. 1, z ktorej vyplýva pokrok v systematike kvasiniek. V roku 1904 publikoval článok o systematike rodu *Saccharomyces*, čo bol významný krok v rozvoji klasifikácie kvasiniek, kde detailizoval sedem rodov. Vypestoval druh *Saccharomyces carlsbergensis* (pomenované na počesť svojho zamestnávateľa, 1908) a *Saccharomyces monacensis* (podľa piva z Mníchova – Monachium = Mníchov). Od tohto obdobia boli opísané ďalšie druhy a variety.



Digitized by Google

Original from
CORNELL UNIVERSITY

Obr. 2 Reessove kresby (1870) kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*: obr. 1-6; *S. exiguus* obr. 7-8; Kvasinky z usadeniny brusselských kvasiniek, obr. 9 (a. *S. cerevisiae*, b. *S. elipsoides*) až obr. 10 (*S. cerevisiae*); *S. pastorianus* obr. 11-13; *S. conglomeratus* obr. 14-16

Roky	Počet pomenovaných druhov	Počet druhov so súčasne známou identitou ^x
1830 - 1839	4	1
1840 - 1849	18	1
1850 - 1859	14	9
1860 - 1869	4	4
1870 - 1879	19	11
1880 - 1889	55	23
1890 - 1899	91	45

Tab. 1 Počty druhov kvasiniek pomenovaných v 19. storočí
^x istota o súčasnej identite závisí od existencie autentického kmeňa

V roku 1912 Alexandre Guilliermond stanovil prvý systém pre klasifikáciu kvasiniek založený na morfológii buniek a niekoľkých fyziologických testoch ako je schopnosť skvasovať určitý počet monosacharidov. Nasledovalo niekoľko štúdií o taxonómii kvasiniek. Systém klasifikácie kvasiniek bol progresívne rozširovaný: počet fyziologických testov (založených najmä fermentácii a asimilácii rôznych zložiek ako samotného uhlíka alebo zdrojov dusíka) sa zvýšil a bolo zahrnuté aj vyhodnotenie biochemických charakteristík. V závislosti na teste boli kvasinky zoskupované viacerými postupmi a počet druhov v rode *Saccharomyces* sa príslušne menil. Tab. 2 ilustruje príklad pre rozličné grupovanie a pomenovanie *Saccharomyces sensu stricto* podľa najrelevantnejších klasifikácií medzi rokmi 1912 a 1998.

1912 Guilliermond	1952 Lodder- Kreger van Rij	1970 Lodder	1983 Barnett et al.	1998 Kurtzman – Fell
<i>S. cerevisiae</i> <i>S. ellipsoides</i> <i>S. turbidans</i> <i>S. ilcis</i> <i>S. vordermanni</i> <i>S. sake</i> <i>S.</i> <i>cartilagonosus</i> <i>S. batatae</i> <i>S. tokyo</i> <i>S. yeddo</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. bayanus</i> <i>S. pastorianus</i> <i>S. paradoxus</i>
<i>S. willianus</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. validus</i>	<i>S. willianus</i>			
<i>S. coreanus</i>	<i>S. coreanus</i>	<i>S. coreanus</i>		
<i>S. carlsbergensis</i> <i>S. monacensis</i>	<i>S. carlsbergensis</i> <i>S. uvarum</i> <i>S. logos</i>	<i>S. uvarum</i>		
<i>S. logos</i> <i>S. uvarum</i> <i>S. bayanus</i>	<i>S. bayanus</i> <i>S. pastorianus</i> <i>S. oviformis</i>	<i>S. bayanus</i>		
	<i>S. heterogenicus</i>	<i>S. heterogenicus</i>		
	<i>S. chevalieri</i> <i>S. fructuum</i>	<i>S. chevalieri</i>		
	<i>S. italicus</i> <i>S. steineri</i>	<i>S. italicus</i>		
	<i>S. globosus</i>	<i>S. globosus</i> <i>S. acetii</i> <i>S. prostoserdovi</i> <i>S. oleginosus</i> <i>S. olaceus</i> <i>S. capensis</i> <i>S. diastaticus</i> <i>S. hispaniensis</i> <i>S. inusitatus</i> <i>S. norbensis</i> <i>S. abuliensis</i> <i>S. cordubensis</i> <i>S. daditensis</i> <i>S. hispalensis</i>		

Tab. 2 Zmeny grupovania a pomenovania druhov *Saccharomyces sensu stricto* podľa najvýznamnejších taxonomických monografií

Pozn.: v roku 2000 boli zahrnuté tri nové druhy *Saccharomyces sensu stricto*: *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* a *S. mikatae*

Najznámejšia úplná klasifikácia kvasiniek podľa zjednodušených taxonomických znakov bola zostavená Holanďankami Jacominou Lodder a Nelly Kreger-van Rij (niekde i Kreger van Rijn) v roku 1952 (tzv. holandská škola). Tento systém je všeobecne uznávaný najmä v pivovarníctve. V technickej mikrobiológii bola používaná aj systematika podľa Kudrjavceva z roku 1954. Relevantným znakom pre rozdelenie kvasiniek v rámci rodov je ich schopnosť skvasovať maltózu a sacharózu. Na tomto základe Kocková-Kratochvílová zaviedla štyri kvasné typy kvasiniek.

Typ	Skvasovanie	
	maltózy	sacharózy
I.	+	-
II.	+	+
III.	-	+
IV.	-	-

Tab. 3 Kvasné typy kvasiniek podľa schopnosti skvasovať maltózu a sacharózu.

Podľa tohto systému sa kvasinky rozdeľujú do troch čeladi: čelad' askosporogénnych kvasiniek *Endomycetaceae*, čelad' tvoriaca bazidiospóry *Sporobolomycetaceae* a čelad' netvoriaca spóry – asporogénne kvasinky *Cryptococcaeae*. Do prvej čelade *Endomycetaceae* patrí väčšina produkčných kvasiniek, do ostatných dvoch patria kvasinky kontaminujúce, z hľadiska produktivity kvasného procesu spravidla škodlivé. Treba povedať, že pri liehovom kvasení sa uplatňuje mnoho kvasiniek, takže v kvasoch možno nájsť prakticky zástupcov všetkých troch hlavných čeladi.

Rod *Saccharomyces* má dva komplexy druhov: *Saccharomyces sensu stricto* (pôvodne nazvaný van der Waltom v Lodderovej štúdii v roku 1970 ako *Saccharomyces* druh v pravom slova zmysle viazaný na kvasný priemysel) a *Saccharomyces sensu lato* obsahujúci druhy, ktoré sú menej príbuzné *S. cerevisiae*. Rod *Saccharomyces* aktuálne zahŕňa 6 biologických druhov a 1 hybrid: *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus* a hybrid taxónu *S. pastorianus* (syn. *S. carlsbergensis* – hybrid *S. cerevisiae* a príbuznej variety *S. bayanus*). Do komplexu *Saccharomyces sensu stricto* patria štyri z nich: *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus* a *S. paradoxus*. Druhy obsiahnuté v tejto skupine sú veľmi príbuzné a v mnohých prípadoch nevykazujú zreteľnú separáciu. Druh *Saccharomyces cerevisiae* je pivovarská, vinná, liehovarská a pekárská kvasinka. Fermentuje glukózu, galaktózu, sacharózu, maltózu a rafinózu. Laktózu a dusičnan neasimiluje. Z fyziologických vlastností má najväčší praktický význam ich schopnosť skvasovať hexózy na etanol a oxid uhličitý.

Z aspektu potravinárskej mikrobiológie sa relevantné rody a druhy nachádzajú v rade *Endomycetales*, syn. *Saccharomycetales* (perfektné kvasinky) a v rade *Cryptococcales* (imperfektné kvasinky). Z nich je pre potravinársku prax významných asi dvadsať rodov a k nim prináležiacich druhov. Využitie majú najmä v kvasnom priemysle pri výrobe liehu, piva, vína, pekárskeho droždia ako aj niektorých mliečnych nápojov. Význam majú aj krmne zmesi z kvasníc. Sú zdrojom dobre stráviteľných bielkovín (asi 40 %), cukrov a najmä komplexu vitamínu B, čo je význačné u pivovarských kvasiniek. Tieto sa

využívajú pri liečbe rôznych ochorení ako napr. nervových chorôb, zápalových kožných chorôb, chorôb pečene a porúch tráviaceho traktu.

Z prevádzkového aspektu sa pri väčšom rozmnožení v živnom substráte sa hmota kvasiniek stáva viditeľnou voľným okom a javí sa ako mäkká, bledožltkavá až biela beztvárá hmota. Bunky kvasiniek v prevádzkovom prostredí adsorbujú na svojom povrchu koloidné látky a kaly. Preto sa ich hmota viac sfarbuje do hnedá. Po riadnom vypraní v čistej tvrdej vode dostávajú znovu jasnú farbu. V prevádzke nazývame hmotu kvasiniek, napríklad usadeninu v kadi, vo vaniach alebo vylisovanú usadeninu kvasnicami. Ak ich však posudzujeme z mikrobiologického hľadiska, používame výhradne názov kvasinky. Ak sa bunka kvasinky rozmnoží tak, že vytvorí usadeninu v nádobe, kolóniu alebo náter na tuhej živnej pôde, hovoríme o kultúre kvasiniek. Ak sa táto kultúra skladá z rovnorodých jedincov z potomstva jedinej bunky alebo spóry, nazývame ju čistou kultúrou. Ak kultúra obsahuje bunky niekoľkých rozličných kultúr, nazývame ju zmesovou kultúrou. Zmesové kultúry pripravujeme alebo zámerne z niekoľkých technických kultúr, alebo môžu vznikáť náhodne pre nedostatočnú prípravu alebo počas prevádzky. Takto vzniká infikovaná alebo kontaminovaná kultúra. V propagačných nádobách má byť vždy čistá kultúra. V prevádzke už nemôžeme hovoriť o čistej kultúre, pretože môže byť infikovaná rozličnými mikroorganizmami zo vzduchu alebo z prevádzkového zariadenia. Ak čistú kultúru presne opíšeme a druhove zaradíme, vedieme ju ako kmeň. Kmeň je teda čistá kultúra, ktorá sa v podstate nelíši od charakteru druhu. Kmeňov rovnakého druhu môže byť neobmedzené množstvo. Odlišujú sa navzájom najmä miestom pôvodu a v krajnom prípade takými znakmi, ktoré nespádajú do kritérií znakov systematiky, Zvyčajne každý veľký pivovar alebo liehovar má svoj prevádzkový kmeň.

Triedenie potravinársky významných kvasiniek je nasledovné:

Kvasinky tvoriace askospóry (*Endomycetales*, perfektné kvasinky)

Rody *Schizosaccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Saccharomycodes*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Dekkera*, *Metschnikowia*, *Torulasporea* a spojený rod *Pichia* Hansen, ktorý sa rozdeľuje na dva podrody *Pichia* a *Hansenula*

Asporogénne kvasinky (*Cryptococcales*, *Fungi imperfekti*)

Rody *Geotrichum*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Kloeckera*, *Brettanomyces*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*

Kvasinky sú jednobunkové hubové mikroorganizmy, väčšina z nich patrí do pododdeenia vrekatých húb *Ascomycotina*, niektoré ale aj do pododdelenia bazídiových húb *Basidiomycotina*. Z tohto dôvodu netvoria spoločnú taxonomickú skupinu. K rozlíšeniu jednotlivých rodov a druhov kvasiniek sa používa kritérií morfológických (morfológia buniek a kolónií, spôsob pučania, tvorba pseudomycélia), fyziologických (kultivačná teplota, sporulácia, farbivá) a biochemických (zistuje sa spôsob skvasovania jednotlivých cukrov, asimilácia cukru a iných uhlíkatých zdrojov a tvorba kyselín). Kvasinky netvoria plodnice, rozmnožujú sa najmä asexuálne (vegetatívne) tzv. pučaním. Môžu sa rozmnožovať aj sexuálne tvorbou askospór, ktoré však nie sú uzavreté v žiadnych

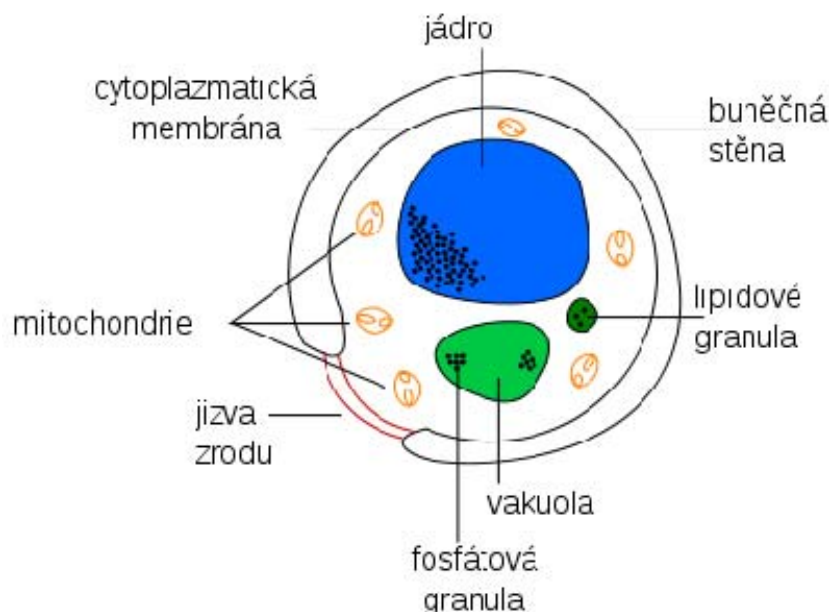
plodniciach (askokarpoch). Netvoria pravé myceliálne štruktúry, len pseudomycélium, ktoré je podobné kolóniám jednobunkových organizmov.

Kvasinky pre svoj rast potrebujú, podobne ako plesne vzdušný kyslík. Svoj metabolizmus však za anaeróbných podmienok dokážu premeniť na fermentačný a pri značne obmedzenom raste svojej bunkovej hmoty produkovať etanol a CO₂. Niektoré kvasinky môžu dobre rásť aj pri podstatne zníženom parciálnom tlaku kyslíka. Kvasinky rastú v širokom diapazóne hodnôt pH (pH 3 až 11) a teplôt (0 až 45 °C). Z aspektu potravinárskej mikrobiológie sa relevantné rody a druhy nachádzajú v rade *Endomycetales*, syn. *Saccharomycetales* (perfektné kvasinky) a v rade *Cryptococcales* (imperfektné kvasinky). Z nich je pre potravinársku prax významných asi dvadsať rodov a k nim prináležiacich druhov. Využitie majú najmä v kvasnom priemysle pri výrobe liehu, piva, vína, pekárskeho droždia ako aj niektorých mliečnych nápojov. Význam majú aj kŕmne zmesi z kvasníc. Sú zdrojom dobre stráviteľných bielkovín (asi 40 %), cukrov a najmä komplexu vitamínu B, čo je význačné u pivovarských kvasiniek. Tieto sa využívajú pri liečbe rôznych ochorení ako napr. nervových chorôb, zápalových kožných chorôb, chorôb pečene a porúch tráviaceho traktu.

2.1.1 Stavba kvasinky

Z morfológického hľadiska kvasinky vykazujú veľkú diverzitu ich tvaru, rozmeru či farby. Spravidla majú guľatý alebo oválny tvar. Vyskytujú sa však aj druhy s bunkami citrónovitého (apikulárne), fľaškovitého či vláknitého tvaru. Je zaujímavé, že aj medzi samotnými bunkami jedného kmeňa možno nájsť rozdiely, pokiaľ ide o morfológiu a farbu. Toto však závisí zmien fyzikálno-chemických podmienok v prostredí. Preto sa týchto znakov využíva k taxonomickému zaradeniu. Základným rozlišovacím znakom kvasinkovitých buniek oproti bakteriálnym je ich veľkosť, približne 3-15 µm (baktérie bývajú väčšinou o rád menšie).

Pre ilustrovanie štruktúrnej stavby kvasiniek použijeme štruktúru kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*:



Obr. 4 Schéma štruktúry bunky kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae tvorí bunky dvojakého typu – väčšie o rozmeroch (5 až 10) x (6 až 12) μ a menšie (3 až 7) x 4,5 až 10) μ . Priemerná veľkosť sa pohybuje v rozmedzí (3,5 až 8) x (5 až 15) μ . Priemerný objem buniek je 29 – 55 μm^3 pre haploidné i diploidné bunky. Veľkosť bunky sa zväčšuje s vekom.

Cytológia

Bunková stena:

Bunková blana kvasinky zaisťuje ochranu bunky pred mechanickými vplyvmi, osmotickým šokom a udáva jej tvar. Jej hrúbka sa obvykle pohybuje okolo 15 – 400 nm. Póry v bunkovej stene sú pomerne veľké, prejdú nimi všetky zlúčeniny okrem vysokomolekulárných látok ako sú sacharidy alebo bielkoviny.

Kidby a Davis v roku 1970 navrhli model bunkovej steny pre druh *Saccharomyces cerevisiae*, podľa ktorého má táto stena tri vrstvy – vonkajšiu, strednú a vnútornú. Vonkajšia vrstva je orientovaná smerom do prostredia a obsahuje mannanproteíny spojené disulfidovými mostíkmi., stredná je tvorená β -1,6 glukánom, glukanproteínmi a mannanproteínmi. Vnútorná vrstva prilieha na cytoplazmatickú membránu a je zložená z mikrokryštalického β -1,3 glukánu.

Bunky kvasiniek sú charakteristické tým, že ich bunková stena tvorí (na rozdiel od všetkých ostatných mikroorganizmov) tzv. jazvy, čo sú trvalé kruhové štruktúry vzniknuté pučaním. Jazva teda vzniká v mieste, kde sa púčik oddelil od materskej bunky. Kvasinky rodu *Saccharomyces* pučia multipolárne, t. j. púčik nevznikne dvakrát na tom istom mieste. Môžeme potom určiť akú starú bunku pozorujeme. Ďalším typickým javom pre kvasinkovité bunky, na ktorom sa podieľa bunková stena je flokulácia buniek a ich následná sedimentácia – je to významný faktor pre niektoré potravinárske produkcie ako napr. výroba vína a piva.

Cytoplazmatická membrána

Funkcia a zloženie cytoplazmatickej membrány u kvasiniek sa skoro nelíši od bakteriálnej. Hrúbka je menšia než u bunkovej steny, obvykle v rozmedzí 7,5 – 8,0 nm. Obsiahnuté sú predovšetkým lipidy a proteíny. Hlavné funkcie spočívajú v priepustnosti pre malé molekuly bez náboja a tvorbe osmotického rozhrania medzi bunkou a vonkajším prostredím.

Cytoplazma

Možno ju opísať ako homogénnu priehľadnú hmotu, v starších bunkách tu možno pozorovať tvorbu malých zrníčok a postupnú vakuolizáciu. Ďalej je tu systém dvojitéch membrán, ktoré slúži ako úložisko enzýmov a rezervných látok.

Mitochondrie

Predstavujú ďalšiu organelu v bunke kvasiniek, ktorá je ohraničená dvomi membránami. V ich zložení majú hlavné zastúpenie bielkoviny, lipidy a fosfolipidy spolu s RNA a malým množstvom DNA. Sú zároveň i sídlom enzýmov dýchania.

Vakuola

Počet a veľkosť vakuol závisí na viacerých faktoroch ako napr. vek bunky, vonkajšie prostredie. U mladších buniek sa skôr vyskytujú menšie vakuoly vo väčšom počte než u

starších, kde je väčšinou jedna vakuola väčších rozmerov. Je ohraničená tenkou membránou a jej funkcia spočíva hlavne v ukladaní látok, ktoré momentálne nie sú potrebné pre metabolizmus.

Cytoskelet

Cytoskelet predstavuje sieť proteínových vlákien, ktoré pretkávajú celú bunku, vrátane jadra. Cytoskelet umožňuje vnútrobunkový pohyb organel a zmenu tvaru bunky pri pučení a konjugácii.

Jadro

Jadro kvasiniek je od cytoplazmy oddelené dvojitou jadrovou membránou s veľkými pórmí. Väčšinou býva umiestnené v strede bunky. U najlepšie preštudovanej kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* sa zistilo 16 chromozómov v haploidnom jadre, diploidné jadro má dvojnásobný počet. V odvrátenej časti jadra od pupeňa sa nachádza jadierko. Dôležitou súčasťou jadra sú tzv. plazmidy, čo je nízkomolekulárna DNA usporiadaná do kruhu.

2.1.2 Chemické zloženie buniek kvasiniek

V literatúre sa uvádza najmä chemické zloženie hmoty produkčných kvasiniek ako sú pivovarnícke, pekárske, vínne a kŕmne kvasinky. Hodnoty sa však značne odlišujú – v rozdieloch sa odrážajú nielen druhy a rasy kvasiniek, ale aj podmienky, v ktorých kvasinky produkovali a na akých živných pôdach sa rozmnožovali. Množstvo produkčných kvasiniek sa stále zväčšuje, hľadajú sa najlepšie produkčné kmene. Potom samozrejme aj chemické zloženie bude rôzne. Preto nasledujúce údaje o chemickom zložení kvasiniek sú potrebné pre základnú orientáciu čitateľa.

Elementárne zloženie biomasy pivovarských kvasiniek:

Uhlík 44 až 50 %

Vodík 6 až 8 %

Dusík 8 až 12 %

Kyslík 30 až 36 %

Pekárske kvasinky a kŕmne droždie obsahujú tieto hlavné zložky:

Bielkoviny 45 až 60 %

Sacharidy 25 až 35 %

Lipidy 4 až 7 %

Popol 6 až 9 %

Zloženie popola:

P_2O_3 36 až 65 %

K_2O 26 až 48 %

MgO 3 až 8 %

CaO 0,4 až 11, 3 %

Na_2O 0,3 až 2,5 %

SiO_2 0,0 až 1,8 %

SO_4 0,09 až 7,2 %

Fe_2O_3 0,02 až 15,6 %

Cl 0,03 až 1,0 %

Obsah vody v pevne usadených alebo lisovaných kvasinkách býva 72 až 75 % a obsah sušiny 25 až 28 %

V pivovarníckych kvasinkách sa stanovuje obsah rôzne viazaného fosforu zo sušiny ako P₂O₅

Celkový 4,2 až 4,7 %

Organicky viazaný 1,46 až 2,7 %

Anorganicky viazaný 1,46 až 3,22 %

Organicky viazaná síra môže byť v sušine rôznych kvasiniek:

Pivovarníckych 0,55 %

Mycéliových 0,36 až 0,55 %

Kvasiniek y mliečnych výrobkov 0,44 %

V kvasinkách z hydrolyzátov dreva 0,37 %

V literatúre možno nájsť aj ďalšie analýzy, ktoré sú vyžadované príslušnými normami výrobných podnikov. Prehľad najdôležitejších látok v bunke kvasiniek je v tab. 4.

Nízkomolekulové látky	Vysokomolekulové látky	Komplexy
puríny a pyrimidíny	nukleové kyseliny	nukleoproteíny
aminokyseliny	bielkoviny	
monosacharidy, oligosacharidy	polysacharidy	glykoproteíny
lipidy a ich zložky		lipoproteíny
vitamíny, steroly		enzýmy
hormóny a iné		
voda		

Tab. 4 Prehľad najdôležitejších látok v bunke

Sušina kvasiniek obsahuje 90 až 95 % organických látok a 5 až 10 % anorganických. Z organických látok majú najväčší podiel bielkoviny (50 až 60 %). Toto množstvo bielkovín môže však pri rozličných vplyvoch klesnúť alebo aj stúpnuť. Chromatograficky sa zistilo okolo 18 rozličných aminokyselín v autolyzátach pivovarských a liehovarských kvasiniek ako cystín, histidín, glykokol, asparagín, glutamín, arginín, hydroxyprolín, alanín, prolín, valín, fenyl alanín, tyrozin, leucín, izoleucín a ďalšie. Ďalšou dôležitou skupinou dusíkatých látok v kvasinkách sú nukleoproteidy, ktorých obsah predstavuje asi 26 % z celkového obsahu bielkovín.

Množstvo tuku v kvasinke závisí od stavu kvasničnej kultúry. Bezdušikaté organické látky sú v kvasinkách zastúpené cukrami, hemicelulózami, kvasničnými gumami, glukozidmi apod. Vyskytujú sa v bunkovej plazme, stene a čiastočne aj v jadre. Tvoria asi 9 až 11 % sušiny. Kvasinky okrem týchto organických látok obsahujú ešte vitamíny ktoré síce nezasobujú bunku energiou a nezužívajú sa ako stavebné jednotky bunkovej hmoty, sú však základom pre premenu energie a pre reguláciu metabolizmu štruktúrnych jednotiek. Práve tieto látky pôsobia blahodárne pri používaní kvasiniek pri niektorých chorobách.

Anorganická látky obsiahnuté v kvasinkách sa stanovujú z popola kvasiniek (viď vyššie).

2.1.3 Metabolizmus kvasiniek

V bunkách kvasiniek sa odohráva látková premena, ich činnosťou potom aj v prostredí, kde rastú a kde sa rozmnožujú. Tento proces sa nazýva metabolizmus (z gréckeho *metabolismos* = zmena) a môže v podstate smerovať k biosyntéze látok, rôznych zložiek bunky a jej obalov (anabolické procesy) alebo k rozkladu látok – degradácii nazývanej katabolizmus alebo disimilačný proces. V prvom prípade bunka na realizáciu potrebuje energiu, v druhom prípade ju uvoľňuje. Väčšina reakcií oboch spomínaných typov potrebuje na svoje uskutočnenie *biokatalyzátory* – enzýmy znižujúce množstvo potrebnej energie na začatie reakcií – aktivačnej energie.

Termín „enzým“ (z gréckeho „v kvasinke“) prvýkrát použil v roku 1878 nemecký fyziológ Wilhelm Kühne (1837-1900) za účelom rozlíšiť dvojaký význam slova ferment, teda fermenty, pod ktorými sa rozumeli mikroorganizmy a fermenty ako chemické substancie, ktoré majú katalytické vlastnosti (napr. pepsín). Enzým sa skladá z dvoch častí: z bielkovinové zložky – apoenzýmu – a z nebielkovinovej, obyčajne nízkomolekulovej zložky – koenzýmu (alebo prostetickej skupiny). Mechanizmus pôsobenia enzýmu sa začína tvorbou komplexu enzýmu a substrátu, kde sa uplatňuje väzba substrátu na určitú skupinu atómov enzýmu, ktorá sa nazýva aktívne alebo aj katalytické centrum. Takéto centrum môže byť jedno alebo aj viac. Enzýmy sa môžu združovať do komplexov. Aktivitu enzýmov ovplyvňujú viaceré faktory ako teplota, pH, koncentrácia substrátu, rH apod. Látky zvyšujúce aktivitu enzýmu sa nazývajú aktivátory, a naopak látky aktivitu brzdiace sa nazývajú inhibítory. Inhibície enzýmov sú rôzneho druhu: 1. kompetitívne, súťaživé, 2. nekompetitívne, nesnaživé a 3. alosterický inhibítor. Koenzýmy možno zahrnúť do troch skupín: 1. koenzýmy prenášajúce vodík alebo elektróny, 2. koenzýmy prenášajúce skupiny a 3. koenzýmy lyáz a ligáz. Dnes sa enzýmy rozdeľujú do šiestich tried:

1. Oxidoreduktázy (prenášanie elektrónov)
2. Transferázy (prenášanie atómov)
3. Hydrolázy (hydrolytické štiepenie väzieb)
4. Lyázy (štiepenie väzieb inak ako hydrolyticky)
5. Izomerázy (vnútromolekulové presuny v substráte)
6. Ligázy (zlučovanie dvoch molekúl za súčasného štiepenia pyrofosfátovej väzby ATP alebo iného analogického substrátu).

Pre akýkoľvek druh metabolizmu je základnou podmienkou transport metabolizovaných látok (živín) do vnútorného prostredia bunky, teda u kvasiniek priechod živín cez plazmatickú membránu a bunkovú stenu. K selekcii dochádza len na plazmatickej membráne, bunkovou stenou prechádzajú všetky živiny bez rozdielu. Cez plazmatickú membránu prejde aj pomerne veľká molekula. Teda miera priechodnosti nie daná ani tak veľkosťou molekúl ako inými faktormi ako je napr. rastová fáza, v ktorej sa kultúra nachádza, na náboji molekuly a na symetrii molekuly. Možno rozlíšiť tri typy transportu, ktorý sa uplatňuje v kvasničnej bunke:

1. jednoduchá difúzia – látky difundujú vo veľkej koncentrácii do bunky v koncentračnom spáde. Tento spôsob nevyžaduje prísun energie. Je to prechod malých molekúl membránou bez účasti prenášača hydrofilnými pórmi alebo cez lipofilnú časť

membrány. Prostredníctvom jednoduchej difúzie prebieha transport väčšiny anorganických látok ako K^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , NH_4^- , SO_4^{2-} a ďalších.

2. uľahčená difúzia – tu je potrebná prítomnosť prenášača v membráne, nie je potrebný prísun energie. Týmto spôsobom sú prenášané väčšie molekuly.

3. primárny aktívny transport - prebieha proti koncentračnému spádu, je potrebné dodať energiu. Prebieha za spoluúčasti membránového nosiča, čo je špecifická bielkovina a umožňuje transport fosforečnanov.

Metabolické pochody sú veľmi ovplyvňované koncentráciou Zn (spomalenie priebehu kvasenia) a už nízkymi koncentraciami takých prvkov ako Ag, Cd, Hg, Li, Be, Ni, As, B a Cu (inhibítory metabolického procesu). Priemyslovo najvyužívanejším a najpreštudovanejším metabolizmom u kvasiniek je anaeróbny katabolický proces, tzv. glykolýza alebo Embden-Meyerhofova metabolická cesta, resp. dráha (viď ďalej).

Metabolizmus sacharidov: metabolizmus sacharidov pivovarskými kvasinkami zahrňuje za normálnych podmienok asi z 98 % kvasenie, z toho 95 % prostredníctvom glykolýzy a z asi 3 % vedľajšími metabolickými dráhami. Približne 2 % sacharidov je odbúravané anaeróbne, z toho asi 1, 6 % v citrátovom cykle. Rod *Saccharomyces* neskváruje pentózy. Transport monosacharidov prebieha uľahčenou difúziou. Transport di- a trisacharidov je zložitejší – sacharóza je štiepené ešte pred vstupom do bunky pomocou enzýmu invertázy. Priebeh metabolizmu hexózu ovplyvňujú podmienky fermentácie. Za anaeróbnych podmienok prebieha kvasenie podľa Embden-Meyerhof-Parnasovej schémy glykolýzy.

Metabolizmus dusíkatých látok: pri ňom najmä u aminokyselín sú anabolické a katabolické procesy v rovnováhe. Tento proces zahrňuje predovšetkým biosyntézu bielkovín.

Metabolizmus lipidov: má veľmi malý význam

2.2 Kontaminujúce baktérie a ďalšie škodlivé mikroorganizmy v liehovarníckej prevádzke a ochrana proti nim

Kvasenie v liehovaroch a páleniciach prebieha v nesterilnom prostredí a preto sú kvasinky pravidelne sprevádzané baktériami a plesňami. Z veľkého počtu rôznych baktérií býva v kvasoch prítomné pomerne málo druhov. O ich výskyte rozhoduje zloženie substrátu – ak nie sú dané základné podmienky, nemôžu sa baktérie rozmnožovať ani vtedy, ak boli v surovine prítomné. Najčastejšie sa v kvasoch vyskytujú baktérie kyselinotvorné a štiepiace bielkoviny.

2.2.1 Mliečne baktérie

Mliečne baktérie sa môžu rozvíjať všade tam, kde sú v substráte prítomné sacharidy, kde je vhodná teplota a kde sú zdroje organických dusíkatých látok. Z najtypickejších baktérií sú okrem kultúrnych baktérií *Lactobacillus delbrückii* zastúpené *Lactobacillus buchneri* a *Lactobacillus plantarum*. Mliečne baktérie sú krátke ale aj dlhé nepohyblivé tyčinky, často sú v pároch spojených pod tupým uhlom. Vyskytujú aj ako koky, tzv. pediokoky. Mliečne baktérie sú nesporujúce. Niektoré z nich tvoria sliz, ktorý zapríčiňuje infekčnú aglutináciu kvasníc. V cukrových substrátoch vytvárajú až 1, 6 % kyseliny mliečnej. Optimálne teploty sú od 40 do 50°C. Mliečne baktérie sa považujú v kvase za neškodné, niekedy sa dokonca uplatňujú priaznivo. Na druhej strane treba však

upozorniť, že niektoré druhy sú pomerne veľmi škodlivé, pretože vytvárajú okrem kyseliny mliečnej aj prchavé kyseliny. Kultúrne mliečne baktérie sa používali na okyselenie tzv. holovice, ktorou sa zakvášali scukornatené škrobnaté zápary.

2.2.2 Octové baktérie

Väčšina octových baktérií patrí do rodu *Acetobacter*. Oxidujú etanol na kyselinu octovú, prípadne až na CO₂ a H₂O. Preto sa vyskytujú všade tam, kde sa vytvoril etylalkohol a kde sa môže oxidovať, t. j. v štádiu dokvášania a v dozretých kvasoch. Pretože octové baktérie potrebujú k oxidovaniu vzduch, udržiavajú sa na povrchu kvasiacich tekutín. Octové baktérie sú krátke alebo dlhšie tyčinky, ktoré môžu byť spojené v reťazcoch, prípadne tvoria kožku na povrchu kvapalín obsahujúcich etylalkohol. Netvorí spóry a možno ich preto ľahko usmrtiť zvýšenou teplotou. Niektoré druhy sú pohyblivé. Pri kvasení produkujú okrem kyseliny octovej aj iné prchavé kyseliny, ktoré sú kvasinkám veľmi škodlivé. Podobne ako u mliečnych baktérií, tak aj u octových baktérií sa kvasenie zastavuje ak sa vytvorí väčšie množstvo kyseliny, u niektorých druhov až 5 % kyseliny octovej. Optimálne teploty pre octové baktérie sú okolo 30 °C. Pri nižších teplotách sa rozvoj octových baktérií inhibuje až zastavuje. Preto možno v niektorých prípadoch zabrániť zoctovateniu kvasov vedením kvasu pri nízkych teplotách. V kvase napadnutom octovými baktériami sa tieto baktérie rozmnožujú tak dlho, pokiaľ všetok alkohol neprevedú na kyselinu octovú. Z typických octových baktérií boli v kvasoch identifikované najmä druhy *Acetobacter pasteurianum*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti* a *Acetobacter suboxydans*. Z kvasov napadnutých octovými baktériami sa získajú len podradné destiláty s vysokým obsahom esterov a prchavých kyselín.

2.2.3 Baktérie maslového a propionového kvasenia

Sú to kratšie a hrubšie tyčinky než kultúrne mliečne baktérie, tvoria spóry. Čiastočne sa farbí jódou na modro. Skvasujú cukor na kyselinu maslovú, CO₂ a vodík, ktorý môže pri priblížení ohňa spôsobiť výbuch. Tvoria kyselinu maslovú ako zo sacharidických tak aj z polysacharidických surovín (škrobu, inulínu). Vedľajšími produktmi bývajú kyselina octová, propiónová, mravčia a butylalkohol. Optimálne teploty pre maslové kvasenie sa pohybujú od 35 do 40 °C. Baktérie sú anaeróbne ale fakultatívne aj aeróbne. Pretože kyselina maslová vytvorená baktériami je nielen jedom pre kvasinky ale je aj závadnou zložkou v destilátoch, patria mliečne baktérie k veľmi škodlivým. Výťažnosť etylalkoholu sa ich vplyvom veľmi znižuje. Vyskytujú sa najčastejšie pri spracovávaní obilia. Najčastejšie bývajú v napadnutých kvasoch prítomné *Clostridium butyricum*, *Granulobacter saccharobutyricum*, *Clostridium sporogenes* a iné. Propionové kvasenie je anaeróbne kvasenie spôsobované baktériami z čeľade *Propionibacteriaceae*.

2.2.4 Hnilobné baktérie

Vyskytujú sa v každom kvase. Sú príčinou rozkladných procesov bielkovín a dusíkatých látok. Do kvasu prichádzajú hlavne s nahnitým ovocím. Sú to rôzne veľké tyčinkovité baktérie, anaeróbne i aeróbne štiepiace bielkoviny až na aminokyseliny a mastné kyseliny, najmä prchavé. Pri rozklade odštiepujú sulfán, amoniak a ďalšie zložky. Pretože nespotrebovávajú cukor, nemajú na výťažnosť vcelku vplyv. Môžu však nepriaznivo

ovplyvniť vlastné kvasenie a kvalitu hotového výrobku (chuť a vôňu destilátu). Destiláty z hnilobných kvasov, z prestarnutých kvasov a z kvasov s „prepadnutými“ dekami sú vždy menejcenné.

Typickými hnilobnými baktériami v liehovarskej prevádzke sú baktérie *Pseudomonas aeruginosa*, tvoriace krátke tyčinky, jednotlivé, v pároch aj v reťazcoch, gramnegatívne, fakultatívne aeróbne. Optimálna teplota je 37 °C. Z ďalších hnilobných baktérií možno spomenúť *Pseudomonas fluorescens* – tyčinkovité baktérie, gramnegatívne s optimálnou teplotou 20 až 25 °C. Baktérie *Serratia marcescens* sú tyčinkovitého tvaru, ktoré rozkladajú bielkoviny a čiastočne skvasujú cukry na prchavé kyseliny. Sú fakultatívne aeróbne. Optimálna teplota je 25 až 30 °C, vyššia teplota obmedzuje ich rast. Hnilobné baktérie *Proteus vulgaris* rozkladajú bielkoviny a dusíkaté látky za tvorby sulfánu, merkaptánov, indolu a mastných kyselín. Produkty rozkladu sú pre kvasinky jedovaté, *Proteus vulgaris* sú pohyblivé tyčinky, optimálna teplota je 37 °C. Podobné sú i hnilobné baktérie druhu *Bacillus putrificus*. Veľmi častou bakteriálnou kontamináciou z tejto kategórie mikroorganizmov sú rôzne neškodné koky a diplokoky ako napr. *Micrococcus*.

2.2.5 Baktérie pektínového kvasenia

Tieto sú pravidelnou zložkou surovín obsahujúcich pektínové látky, ktoré prichádzajú na spracovanie do ovocinárskych liehovarov. V kvasoch sa stretávame potom s typickými baktériami pektínového kvasenia ako napr. *Plectridium pectinovorum* či *Ganulobacter pectinovorum*. Sú to krátke tyčinkovité baktérie tvoriace spóry, ich optimálna teplota je okolo 37 °C.

2.2.6 Butanolové baktérie

Vyskytujú sa na zemiakoch a majú tvar paličiek. Pri butanolovom kvasení sa popri butanole uvoľňuje aj CO₂ a vodík v rovnakom pomere (nebezpečenstvo výbuchu). Sú citlivé voči kyselinám, podobajú sa maslovým baktériám, sporujú a škodia kvasinkám.

2.2.7 Mikroskopické vláknité huby

Tieto mikroorganizmy sa vyskytujú v kvasoch vcelku vzácne, pretože sú silne aerofilné mikroorganizmy a vyžadujú prítomnosť kyslíka. Anaeróbnymi podmienkami liehového kvasenia je teda možné obmedziť ich rast, prípadne mu úplne zabrániť. Omnoho častejšie sa s rozličnými typmi plesní stretávame na stenách výrobní, na kvasných kadiach a vo vlhkých miestach kvasiarní. Odtiaľ sa dostávajú na povrch kvasu a to najmä pri dozrievaní, kedy sa rozrastajú spolu s křísotvornými kvasinkami v súvislých povlakoch a tvoria tzv. deky. Kvasu a teda aj destilátom tým dávajú nepríjemnú chuť a vôňu a okrem toho znižujú výťažnosť tým, že rozkladajú alkohol.

Plesne z rodu *Aspergillus* sa veľmi často vyskytujú na ovocí, kde oxidujú cukry na kyselinu glutarovú, citrónovú a octovú. V kvasoch sa vyskytujú pomerne zriedka. V páleniciach sa vyskytuje *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus oryzae* a *Aspergillus niger*.

Veľmi často sa na povrchu kvasov vyskytujú plesne z rodu *Penicillium*, kde najmä na starých kvasoch vytvárajú zelenosivé deky. *Penicillium* oxiduje cukry na kyseliny a bielkoviny štiepi na amoniak. Vyznačuje sa značnou enzymatickou mohutnosťou. Kvasy, na ktorých sa vyskytli tieto plesne, dávajú destiláty podradnej kvality

s nepríjemnou príchuťou a vôňou po plesniach, ktoré sa z nich odstraňujú len veľmi obtiažne. V páleniciach sa najčastejšie vyskytuje *Penicillium glaucum* – zúčastňuje sa spolu s pliesňou *Botrytis* oxidácie tanínu.

Z ďalších plesní možno spomenúť plesne *Rhizopus*, ktoré sa vyskytujú na ovocí a spolu sním sa dostávajú do kvasu. K svojej životnej činnosti potrebujú dostatok vzduchu, cukry oxidujú na kyseliny octovú, citrónovú a ďalšie produkty. Z plesní rodu *Mucor* sa v kvasoch identifikovali najmä *Mucor racemosus*, *Mucor globosus* a *Mucor plumbeus*. Veľmi často sa v plesňových povlakoch i na stenách miestností a výrobných zariadeniach vyskytujú plesne *Oidium* a *Fusarium*.

2.2.8 Iné bakteriálne kontaminujúce baktérie

V melasových liehovaroch sa môžu veľmi nepríjemne prejavíť baktérie *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*. Tento poddruh sa vyznačuje tvorbou charakteristického dextranového slizu, ktorý produkuje zo sacharózy, najmä pri teplotách 20 až 25 °C. Sú to guľovité baktérie, často reťazovito usporiadané. Tieto sa obaľujú značným množstvom vytvoreného a chrupkovito stvrdnutého slizu. Zrasty týchto chuchvalcov môžu upchať potrubia.

Bakteriálny pôvod má dusičnanové kvasenie, ktoré sa vyskytuje v melasových liehovaroch pri abnormálne infikovanej melase alebo pri veľmi nedbanlivej práci. Prejavuje sa tým, že z kvasiacej zápara vystupujú pary červenohnedého oxidu dusičitého. Tento je prudkým jedom pre kvasinky, liehové kvasenie preto celkom prestáva.

Vplyv kontaminujúcich mikroorganizmov v liehovarníctve možno vylúčiť predovšetkým dôslednou čistotou a to v celom procese, t. j. od prijímania suroviny až po získanie konečného produktu. Najmä základnej surovine a pomocným surovinám sa musí venovať najväčšia starostlivosť z dôvodu, že ide spravidla o kvasenie v nesterilnom prostredí a bez silných zákvasov čistej kultúry kvasiniek. Ochrana môže byť v zásade dvojaká – pasívna a aktívna. Pasívna ochrana spočíva v obmedzovaní možností rastu týchto mikroorganizmov, aktívna ochrana je priame ničenie týchto mikroorganizmov účinnými látkami a prostriedkami. Pasívna ochrana je v podstate výhodnejšia, pretože je prirodzenejšia, lacnejšia, menej násilná a spravidla nepoškodzuje, naopak prospieva kultúrnym mikroorganizmom, v tomto prípade kvasinkám.

V priemyselných liehovaroch, ktoré spracovávajú melasu, je nebezpečenstvo infekcie veľké, pretože použitá surovina, prípadne zápara z nej pripravená sa vlastne vôbec nesterilizuje. V poľnohospodárskych liehovaroch pri spracúvaní škrobnatých surovín alebo v droždiarňach sa spracúvané suroviny sterilizujú. Tam sa všetka melasa v zriedenom stave pred použitím varí, používaná zried'ovacia voda zodpovedá požiadavkám na pitnú vodu. Melasa je surovina infikovaná pestrou zmesou mikroorganizmov. Pretože pred prípravou zápara v liehovare sa ohrieva buď samotná melasa, aby sa ľahšie čerpala, alebo sa rozried'uje teplou vodou, aby sa ľahšie rozpustila, vytvorí sa vhodné podmienky pre spontánny rozvoj všetkých mikroorganizmov, ktoré pôvodne obsahovala. Čím dlhšie je takýto roztok v pokoji, tým viac vzrastá infekcia. Infikovaná zápara (nesterilizovaná) aj keď ďalej infikovaná zried'ovacou povrchovou vodou (riečnou) pri správnom dodržiavaní technologického postupu nie je pre liehové kvasenie nebezpečná, pretože mohutným zakvasením kultúrnymi kvasinkami sa ich

prevahou potlačia cudzie mikroorganizmy. V tomto „boji“ sú kvasinky podporované ak okyselením, ktoré vytvára priaznivejšie prostredie pre ne a nepriaznivé pre infekciu. Pri kvasení, ktoré prebieha veľmi krátky čas, oslabená infekcia sa nemôže podstatnejšie rozvinúť. Navyše ku koncu kvasenia vzrastá koncentrácia etanolu v zápare v takej miere, že pôsobí zase ako zábrana. Je prirodzené, že zrelá zápara sa čo najrýchlejšie spracuje destiláciou, aby nemohla nastať reinfekcia alebo nežiaduca činnosť mikroorganizmov obmedzovaných počas kvasenia vznikajúcim CO₂. Počas kvasenia sa stále sleduje úroveň kyslosti. Znakom prípadne sa rozširujúcej škodlivej infekcie je jej prírastok. Druhou, veľmi rýchlou kontrolnou skúškou je pozorovanie odobratej vzorky kvasiacej zápary. Kvasnice musia ostať v suspenzii, ak rýchle klesajú ku dnu, svedčí to o infekcii.

V poľnohospodárskych liehovaroch sú podmienky trochu inakšie. Zemiaky sa parením nezbavujú len mechanických nečistôt ale aj najväčšej časti infekčných mikroorganizmov. Zvyšok sa usmrť počas parenia zemiakov pri teplote vyššej ako 100 °C. Nebezpečenstvo reinfekcie takto získaného pareného diela nastáva pri scukrovaní sladom. Preto sa slad dezinfikuje (napr. formalínom). Taktiež možnosť infekcie v kvasných kadiach je väčšia než v priemyselných liehovaroch, pretože jednak sa tu nepoužíva na zakvášanie také veľké množstvo kvasníc a jednak kvasenie je pomalšie (obvykle trojdňové) a možnosť rozvoja infekcie je väčšia. Preto ako prevádzkovú vodu je potrebné používať podľa možnosti pramenitú, mikrobiálne nezávadnú vodu a čo najprísnejšie dodržiavať zásady čistej práce. Tu nemožno používať zvýšenú ochrannú kyslosť, pretože by ňou trpela amyláza, potrebná na docukrovanie dextrínov, ktoré sú v kvasiacej zápare a tým by sa znižovali výťažky liehu.

Pri aktívnej ochrane je viac možností:

Voľba teploty: väčšina baktérií má optimum teploty od 35 do 40 °C, môžu však dobre rásť i pri nižších teplotách. Znížením teploty pri kvasení možno ich množenie a činnosť podstatne obmedziť (napr. pri baktériách *Acetobacter*, *Lactobacillus*). Ak sa používa sterilizácia ohrevom je potrebné si uvedomiť, že nesporelujúce baktérie hynú pri teplote 50 až 60 °C behom 30 minút a pri 70 °C behom 5 minút, kým spórotočné baktérie vydržia teplotu 75 °C niekoľko hodín.

Vplyv žiarenia: Novšie sa k usmerneniu činnosti baktérií používa vplyv žiarenia. Silné antibakteriálne účinky má UV žiarenie, v malých dávkach však môže pôsobiť aj stimulačne. Silný baktericídny vplyv má aj radioaktívne žiarenie.

Vplyv chemických látok: Znalosť pôsobenia niektorých látok ovplyvňujúcich fyziologický stav je dôležitá pre voľbu prostriedkov proti kontaminujúcim mikroorganizmom. Jedným z dôležitých takýchto prostriedkov sú kyseliny. Zatiaľčo väčšina kvasiniek znáša i vyššie koncentrácie po dobu niekoľko minút (napr. *Saccharomyces* sú schopné života ešte po 80 minútach pôsobenia 5 % kyselinou sírovou), baktérie hynú pri omnohonížších koncentráciách už za niekoľko minút. Dôležitý je vplyv oxidu siričitého SO₂. V koncentrácii 0,0025 % pôsobí toxicky skoro na všetky druhy bežných baktérií, čiastočne pôsobí v tejto koncentrácii aj na kvasinky tým, že brzdí ich rast. Na rozdiel od baktérií možno kvasinky na SO₂ adaptovať. Z organických kyselínide najmä o nižšie prchavé mastné kyseliny, ktoré pôsobia toxicky na baktéria i na kvasinky. Tieto kyseliny pôsobia vždy nepriaznivejšie na kvasinky ako na baktérie. Dezinfekčné účinky anorganických a organických látok používaných k dezinfekcii v páleniciach a liehovaroch sú v tab. 5. Dezinfekčné prostriedky delíme podľa ich chemickej reakcie na kyslé, zásadité a neutrálne. Väčšinou sú plazmatické jedy a pôsobia podľa citlivosti mikroorganizmov na rozličné časti bunky. V prvom rade brzdia činnosť mikrobiálnych

enzýmov. Povrchovo účinné látky pôsobia aj na lipoidy bunkovej blany a menia podmienky prostredia v nepriaznivom smere pre rozmnožovanie mikroorganizmov. Niektoré mikroorganizmy si môžu na určitý dezinfekčný prostriedok zvyknúť a vznikajú rezistentné kmene, ktoré prežijú aj vyššie koncentrácie týchto prostriedkov.

Mikroorganizmus	Vápenné mlieko 18 °Bé	Hydroxid sodný		Chlórové vápno		Formalín	SO ₂
		0,5 %	1 %	0,35 % Cl ₂	0,17 % Cl ₂		
<i>Saccharomyces</i>	240	60	15	5	5	5	-
<i>Candida, Torulopsis</i>	240	15	15	5	5	5	-
<i>Penicillium</i>	∞	∞	30	-	240	5	-
<i>Oospora</i>	∞	24 hod	60	-	15	5	-
Octové baktérie	15	15	15	5	5	5	5
Mliečne baktérie	30	120	15	-	5	5	5
<i>Leuconostoc</i>	30	30	15	5	5	5	5
<i>Clostridium, butyricum</i>	30	-	15	5	5	5	5
<i>Bacillus pumilus</i>							5
<i>Proteus vulgaris</i>	15	∞	30	5	-	5	5
<i>Bacilus mesentericus</i>	30	∞	15	5	5	5	5

Tab. 5 Čas potrebný k usmrteniu rôznych mikroorganizmov dezinfekčnými prostriedkami (v minutách)

Pozn.: prepočet staršej jednotky hustoty °Bé na kg.m⁻³ : 18 °Bé ≈ 1143 kg.m⁻³

Použitá literatura

Arora, D.K., Bridge, P.D., Bhatnagar, D., 2004: Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications. Marcel Dekker, New York, 700

Augustín, J., 1982: Liehovarníctvo a výroba mikrobiálnej biomasy. STU, Bratislava, 218

Augustová, K., 2011: Taxonomické zařazení kvasinek rodu *Saccharomyces*. Manuskript – závěreční práce. VUT v Brně, Brno, 66

Bamforth, C.W., 2004: Beer. Health and Nutrition. Blackwell Science, Oxford, 184

Bamforth, C.W., 2005: Food, Fermentation and Micro-organisms. Blackwell Science, Oxford, 216

Bamforth, C.W. (ed.), 2008: Beer. A Quality Perspective. Academic Press, New York, 288

Barnett, J. A. – Payne, R. W. – Yarrow, D., 1983: Yeasts: characteristics and identification. Cambridge University Press, Cambridge (Cambridge Cambridgeshire and New York), 811

Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T., 2010: Pivovarství. Teorie a praxe výroby piva. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, 904

Boulton, C., Quain, D., 2001: Brewing Yeast and Fermentation. Blackwell Science, Oxford, 646

Carrascosa, A.V., Muñoz, R., Gonzáles, R. (eds.), 2011: Molecular Wine Microbiology. Elsevier, Amsterdam, 363

Callec, C., 2006: Encyklopedie sýrů. Rebo, Čestlice, 256

Callec, C., 2006: Encyklopedie vína. Rebo, Čestlice, 320

Clarke, R.J., Bakker, J., 2004: Wine Flavour Chemistry. Blackwell Publishing, Oxford, 326

Collin, S. (ed.), 2004: Ooddbins Dictionary of Wine. Bloomsbury, Londýn, 385

Cooke, G.M., Lapsley, J.T., 1988: Making Table Wine at Home. University of California, Oakland, 44

Crueger, W. – Crueger, A., 1990: Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology. Sinauer Associates, 357

Čmaradová, M., 2011: Výroba erhanolu z obnovitelných zdrojů. Manuskript – závěreční práce. VUT v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Brno, 28

Deák, T., 2008: Handbook of Food Spoilage Yeasts. CRC Press, Boca Raton, 325

- Demain, A. L. – Solomon, N. A., 1986: *Industrial Microbiology And Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, 466
- Dijksterhuis, J., Samson, R.A., 2007: *Food Mycology. A Multifaceted Approach to Fungi and Food*. CRC Press, Boca Raton, 412
- Durieux, A., Simon, J.-P. (eds.), 2002: *Applied Microbiology. Volume 2*. Kluwer Academic Publishers, New York, 275
- Dyr, J. – Grégr, V. – Kuttelvašer, Z. – Seiler, A. – Tomášek, J. – Zelenka, S., 1955: *Lihovarství, I. díl*. SNTL, Praha, 316
- Dyr, J. – Grégr, V. – Seiler, A., 1963: *Lihovarství, II. Díl*. SNTL, Praha, 396
- Edward, M., 2009: *Production of Wine, Beer, Sprints and Liqueurs*. Global Media, Delhi, 179
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delen, N. (eds.), 2007: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer, New York, 403
- Fan, X., Niemira, B.A., Doona, C.J., Feeherry, F.E., Gravani, R.B. (eds.), 2009: *Microbial Safety of Fresh Produce*. Wiley-Blackwell, Iowa, 446
- Fanta, J., 2009: *Charakteristika kvasného a zrácího procesu při výrobě révového vína*. Manuskript – závěreční práce. Universita Tomáše Bati ve Zlíne, Fakulta technologická, Zlín, 68
- Fernandes, R. (ed.), 2009: *Microbiology Handbook. Dairy Products*. Leatherhead Publishing, Surrey, 173
- Fisher, C., Scott, T.R., 1997: *Food Flavours. Biology and Chemistry*. RSC, Cambridge, 165
- Flajs, R., 2011: *Průmyslová výroba lihu*. Manuskript- závěreční práce. VUT v Brně, Fakulta chemická, Brno, 45
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (eds.), 2000: *Fundamentals of Cheese Science*. Springer, New York, 608
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (eds.), 2004: *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology*. Academic Press, New York, 1051
- Fugelsang, K.C., 2007: *Wine Microbiology. Practical Applications and Procedures*. Springer, New York, 393
- Glazer, A. N. – Nikaido, H., 2007: *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge, 554

- Görner, F., Valík, L., 2004: Aplikovaná mikrobiológia požívateľín. Malé centrum, Bratislava, 528
- Grainger, K., 2009: Wine Quality: Tasting and Selection. Blackwell Publishing, Oxford, 163
- Grainger, K., Tattersall, H., 2005: Wine Production: Vine to Bottle. Blackwell Publishing, Oxford, 130
- Guilliermond, A., 1912: Les levures. Octave Doin et fils, Paris,
- Haľama, D. - Brozmannová, J. – Drobnica, L. – Hromec, M. – Hronček, J., 1967: Technická mikrobiológia. SNTL, Bratislava, 332
- Havkin-Frenkel, D., Belanger, F.C. (eds.), 2008: Biotechnology in Flavor Production. Blackwell Publishing, Oxford, 214
- Hettenhaus, J.R., 1998: Ethanol Fermentation Strains. Manuscript, 25
- Hocking, A.D., Pitt, J.I., Samson, R.A., Thrane, U. (eds.), 2006: Advances in Food Mycology. Springer, New York, 371
- Hornsey, I., 2007: The Chemistry and Biology of Winemaking. RSC, Cambridge, 457
- Hughes, P.S., Baxter, E.D., 2001: Beer: Quality, Safety and Nutritional Aspects. RSC, Cambridge, 138
- Hutkins, R.W., 2006: Microbiology and Technology of Fermented Foods. Blackwell Publishing, Oxford, 473
- Charters, S., 2006: Wine and Society. The Social and Cultural Context of a Drink. Elsevier, Amsterdam, 358
- Jacobson, J.L., 2006: Introduction to Wine Laboratory Practices and Procedures. Springer, New York, 375
- Jackson, R.S., 2000: Wine Science. Principles, Practice, Perception. Elsevier, Amsterdam, 645
- Jackson, R.S., 2008: Wine Science. Principles and Applications. Elsevier, Amsterdam, 789
- Jechová, I., 2009: Suroviny a mikroorganizmy pro výrobu pálenek. Manuskript – závěreční práce. VUT v Brně, Brno, 44
- Jennylynd, J. (ed.), 2006: Microbial Hazard Identification in Fresh Fruit and Vegetables. John Wiley & Sons, Hoboken, 312

- Jílek, J. – Zentrich, J. A., 1999: Příprava ovocných kvasů na výrobu slivovice. Dobra & FONTÁNA, Olomouc, 208
- Keevil, S. (ed.), 2009: Wines of the World. Dorling Kindersley, Londýn, 688
- Kociánová, L., 2007: Sledování vlastností kvasinek v průběhu kvašení piva. Manuskript – závěreční práce. VUT v Brně, Brno, 69
- Kocková-Kratochvílová, A., 1982: Kvasinky akvasinkovité mikroorganizmy. ALFA a SNTL, Bratislava, Praha, 488
- Kocková-Kratochvílová, A., 1990: Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov. ALFA, Bratislava, 704
- König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (eds.), 2009: Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Springer, Berlin, 522
- Kudrjavcev, V. I., 1954: Sistematika drožžej. Akademia Nauk, Moskva
- Kurtzman, C. P. – Fell, J. W., 1998: The yeasts, a taxonomic study. 4th ed., Elsevier Science, Amsterdam, 1055
- Linkešová, M. – Paveleková, I., 2007: Vybrané kapitoly z chemickej a potravinárskej technológie. Pedagogická fakulta Trnavskej univerzity, Trnava, 237
- Lodder, J. – Kreger van Rij, N. J. W., 1952: The yeasts, a taxonomic study. North Holland Publishing Company, Amsterdam, 713
- Lodder, J., 1970: The yeasts, a taxonomic study. 2nd ed. North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1835
- Marth, E.H., Steele, J.L., 2001: Applied Dairy Microbiology. Marcel Dekker, New York, 744
- Martin, E., 2009: Wine Encyclopedia. Global Media, Delhi, 155
- Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (eds.), 2009: Wine Chemistry and Biochemistry. Springer, New York, 735
- McNeil, B., Harvey, L.M. (eds.), 2008: Practical Fermentation Technology. John Wiley & Sons, Chichester, 388
- Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. (eds.), 2010: Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Novel Applications. Wiley & Sons, Blackwell Publishing, Iowa, 393
- Olivová, R., 2009: taxonomické zařazení kvasinek rodu *Saccharomyces*. Manuskript. Chemická fakulta, Vysoké učení technické v Brně, Brno, 67

- Pavloušek, P., 2010: Výroba vína u malovinařů. Grada Publishing, Praha, 120
- Pavloušek, P., 2011: Pěstování révy vinné. Grada Publishing, Praha, 333
- Pelikán, M. – Dudáš, F. – Miša, D., 2004: Technologie kvasného průmyslu. Mendelova zemědělská a lesnická universita, Brno, 129
- Pinney, T., 2005: A History of Wine in America. From Prohibition to the Present. University of California Press, Berkeley, 532
- Pospíšilová, D., Sekera, D., Ruman, T., 2005: Ampelografia Slovenska. VŠSVVM, Modra, 368
- Preedy, V.R. (ed.), 2009: Beer in Health and Disease Prevention. Elsevier, Amsterdam, 1101
- Ray, B., 2005: Fundamental Food Microbiology. CRC Press, Boca Raton, 608
- Rebroš, M. – Rosenberg, M. – Krištofiková, L. – Stloukal, R., 2005: Mikrobiálna produkcia palivového etanolu: baktérie alebo kvasinky? Chem. Listy, 99, 402-409
- Rees, M., 1870: Botanische Untersuchungen über die Alkoholgärungspilze. Verlag von Arthur Felix, Leipzig, 88
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A., 2006: Handbook of Enology. Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications. John Wiley & Sons, Chichester, 497
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 2006: Handbook of Enology. Volume 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. John Wiley & Sons, Chichester, 441
- Ridgwayová, J., 2004: Syry. Fortuna Print, Bratislava, 224
- Roberts, D., Greenwood, M. (eds.), 2003: Practical Food Microbiology. Blackwell Publishing, Oxford, 294
- Roehr, M. (ed.), 2001: The Biotechnology of Ethanol. Classical and Future Applications. Wiley, Weinheim, 232
- Saha, B.C. (ed.), 2003: Fermentation Biotechnology. ACS, Washington, 287
- Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (eds.), 2004: Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. Marcel Dekker, New York, 628
- Sandler, M., Pinder, R. (eds.), 2003: Wine. A Scientific Exploration. Taylor & Francis, Londýn, 320

Satyanarayana, T. - Kunze, G. (Eds.), 2009: Yeast Biotechnology Diversity and Application. Springer Science + Business Media, Berlin, 744

Simonová, J., 2011: O víne. Slovart, Bratislava, 224

Stahl, U., Donalies, U.E.B., Nevoigt, E. (eds.), 2008: Food Biotechnology. Springer, Berlin, 269

Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J., 2003: Principles of Fermentation Technology. Butterworth-Heinemann, Burlington, 357

Steidl, R., 2010: Sklepní hospodářství. Národní vinařské centrum, Valtice, 309

Stevenson, T., 2005: The Sotheby's Wine Encyclopedia. Dorling Kindersley, Londýn, 664

Teubner, C., Mair-Waldburd, H., Ehlert F.-W., 2003: Syry – veľká encyklopédia. Trio Publishing, Bratislava, 253

Tvrdoň, M. – Seiler, A., 1963: Kvasná mikrobiológia. ALFA, Bratislava, 238

Uher, J. – Grégr, V., 1964: Průmyslová výroba lihovin. SNTL, Praha, 340

Vogel, H.C., Todaro, C.L. (eds.), 1997: Fermentation and Biochemical Engineering Handbook. Principles, Process Design, and Equipment. Noyes Publications, Westwood, 801

Vogel, W., 2010: Víno z vlastního sklepa. Víkend, Líbeznice, 135

Waites, M. J., 2008: Industrial Microbiology. An Introduction. Wiley – Blackwell, Oxford, 288

Weimer, B.C. (ed.), 2007: Improving the Flavour of Cheese. CRC Press, Boca Raton, 580

White, R.E., 2003: Soils for Fine Wines. Oxford University Press, Oxford, 279

Wüstenfeld, H., 1931: Trikbranntweine und Liköre, ihre Herstellung, Untersuchung und Beschaffenheit. Verlagsbuchhandlung Paul Parey, Berlin, 505