



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

KVASINKY A VÍNO

YEASTS AND WINE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. PETRA PALÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. DANA VRÁNOVÁ, Ph.D.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0402/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Petra Palíková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Mgr. Dana Vránová, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Kvasinky a víno

Zadání diplomové práce:

1. Literární přehled na zadané téma
2. Realizace vhodného postupu izolace DNA z kvasinek
3. Realizace metody PCR-RFLP na řešený problém
4. Zpracování výsledků a jejich zhodnocení

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Petra Palíková
Student(ka)

Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTARKT

Tato diplomová práce se zabývá identifikací vinných kvasinek izolovaných z bobulí a moštu vinné révy. K izolaci byla použita bílá odrůda vína Sauvignon, které bylo pěstováno a vyráběno podle požadavků ekologického zemědělství. Odebrané vzorky byly zpracovány v laboratoři a pomocí zředovací metody byly získány čisté kultury jednotlivých kvasinek. Z těchto čistých kultur byla pomocí komerčního kitu UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit vyizolována DNA, která byla použita k další analýze. Izolovaná DNA byla naamplifikována metodou PCR, za použití ITS1 a ITS4 primerů. PCR produkty byly detekovány elektroforeticky v agarozovém gelu. Naamplifikované vzorky, následně přečištěné, byly podrobeny restrikční analýze, ke které bylo použito pět restrikčních endonukleáz: *HaeIII*, *HinfI*, *TaqI*, *AluI* a *MseI*. Vzorky po restrikční analýze byly opět elektroforeticky detekovány, vizualizovány pod UV detektorem a porovnány s obrazem štěpení sbírkově zařazených kvasinek. Dále byla srovnána similarita těchto izolátů a to za použití programu BioNumerics, kde jako kritérium podobnosti byly zvoleny Pearsonovy koeficienty a UPGMA klastrová analýza. Výsledkem je potom dendrogram genetické podobnosti izolovaných kvasinek.

ABSTRACT

This thesis deals with isolation and identification wine yeasts from grapes and must. For analysis was used white wine Sauvignon that was grown and producing after needs ecological agriculture. Remove samples were processed in laboratory and by the help of dilution method were obtained pure culture isolated yeasts. In the following step, by the application of commercial kit UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit we were able to isolated individual DNA that it was used to the next analysis. Isolated DNA was amplification by PCR method with ITS1 and ITS4 primers. PCR products were detected on agarose gel. Amplification samples were chopped five restriction endonucleases: *HaeIII*, *HinfI*, *TaqI*, *AluI* and *MseI*. Chopped DNA was detected by the same way as PCR products and it was compared with restriction patterns of collection yeasts. In the next step it was compared genetic similarity of isolated yeasts by using BioNumerics software. As a criterion it was used Pearson coefficients and UPGMA clustering analysis. The result is dedrogram of genetics similarity isolated yeasts.

KLÍČOVÁ SLOVA

kvasinky, identifikace, PCR-RFLP, elektroforéza, taxonomie, restrikční analýza, vinařství, výroba vína

KEYWORDS

yeasts, identification, PCR-RFLP, electrophoresis, taxonomy, restriction analysis, viticulture, production wine

BIBLIOGRAFICKÁ CITACE

PALÍKOVÁ, P. *Kvasinky a víno*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou děkuji všem, kteří mě během studia podpořili a umožnili mi dokončit studium na této škole. Dále děkuji Ústavu potravinářské chemie a biotechnologie, zvláště paní Mgr. Daně Vránové, Ph.D a Ing. Haně Šuranské za podporu a rady při zpracování diplomové práce.

OBSAH:

1	ÚVOD	10
2	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1	KVASINKY	11
2.1.1	<i>Systematika kvasinek</i>	11
2.1.2	<i>Morfologie kvasinek</i>	11
2.1.2.1	Morfologie kvasinek	11
2.1.2.2	Morfologie kvasinkových kolonií	11
2.1.3	<i>Cytologie kvasinek</i>	13
2.1.3.1	Buněčná stěna	13
2.1.3.2	Cytoplazmatická membrána	14
2.1.3.3	Cytoplazma	14
2.1.3.4	Mitochondrie	14
2.1.3.5	Ribozómy	15
2.1.3.6	Vakuola	15
2.1.3.7	Golgiho aparát	15
2.1.3.8	Jádro	15
2.1.4	<i>Rozmnožování kvasinek</i>	16
2.1.4.1	Pohlavní rozmnožování	16
2.1.4.2	Vegetativní rozmnožování	17
2.1.5	<i>Potravinářsky významné kvasinky</i>	17
2.1.5.1	Rod <i>Saccharomyces</i>	17
2.1.5.2	Rod <i>Hanseniaspora</i>	18
2.1.5.3	Rod <i>Saccharomyces</i>	18
2.1.5.4	Rod <i>Pichia</i>	19
2.1.5.5	Rod <i>Kluyveromyces</i>	19
2.1.5.6	Rod <i>Candida</i>	20
2.1.5.7	Rod <i>Metschnikowia</i>	20
2.1.5.8	Rod <i>Zygosaccharomyces</i>	21
2.1.5.9	Rod <i>Rhodotorula</i>	21
2.1.5.10	Rod <i>Schizosaccharomyces</i>	22
2.1.6	<i>Fermentační procesy</i>	22
2.1.6.1	Alkoholová fermentace	22
2.1.6.2	Spontánní fermentace	23
2.2	VINAŘSTVÍ	23
2.2.1	<i>Hrozny vinné révy</i>	24
2.2.2	<i>Technologické kroky výroby bílého vína</i>	24
2.2.2.1	Přejímka hroznů	24
2.2.2.2	Získávání moštu z hroznů	24
2.2.2.3	Úprava moštu	25
2.2.2.4	Kvašení moštu	26
2.2.2.5	Dokvašování vína	27
2.2.2.6	Ošetřování a školení vína	27
2.2.2.7	Stáčení vína	29
2.2.3	<i>Nemoci vína</i>	29
2.2.3.1	Křís	29
2.2.3.2	Octovatení neboli octové kvašení	29
2.2.3.3	Mléčné a manitové kvašení	29
2.2.4	<i>Odrůda Sauvignon</i>	30
2.2.5	<i>Ekologická produkce vína</i>	30
2.3	METODY PRO IZOLACI KVASINEK	32
2.3.1	<i>Izolace litím desek</i>	32
2.3.2	<i>Kochova metoda zředování v tekutém médiu a izolace roztěrem</i>	32
2.3.3	<i>Izolace čárkováním na desky</i>	33
2.4	IZOLACE DNA KVASINEK	33
2.4.1	<i>Izolace DNA fenolovou extrakcí</i>	34
2.5	METODY PRO IDENTIFIKACI KVASINEK	34
2.5.1	<i>Polymerázová řetězová reakce (PCR)</i>	34
2.5.1.1	Průběh PCR	35
2.5.2	<i>Restrikční analýzy</i>	36
2.5.2.1	RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů)	36

2.5.2.2	PCR-RFLP	36
2.5.2.3	Restrikční endonukleázy	36
2.5.3	<i>Elektroforéza</i>	37
2.5.3.1	Princip elektroforézy	38
2.5.3.2	Elektroforéza v agarózovém gelu (AGE)	38
3	PRAKTICKÁ ČÁST	39
3.1	CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE, SUROVINY	39
3.1.1	<i>Chemikálie</i>	39
3.1.2	<i>Přístroje a pomůcky</i>	39
3.1.3	<i>Suroviny a mikroorganismy</i>	40
3.2	PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ	41
3.2.1	<i>Příprava sladinného kultivačního média</i>	41
3.2.2	<i>Příprava šikmých agarů</i>	41
3.3	ODBĚRY Z PŮDY, LISTŮ, BOBULÍ A MOŠTU VINNÉ RÉVY	41
3.4	IZOLACE ČISTÉ KULTURY KVASINEK	42
3.5	IZOLACE KVASINKOVÉ DNA	42
3.6	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ POTŘEBNÝCH PRO METODU PCR, RESTRIKČNÍ ANALÝZU A ELEKTROFORETICKOU DETEKCI FRAGMENTŮ	43
3.6.1	<i>Příprava Tris-borátového pufru (TBE)</i>	43
3.6.1.1	<i>Příprava zásobního roztoku 10xTBE</i>	43
3.6.1.2	<i>Příprava pracovního roztoku 1xTBE bez ethidium bromidu</i>	44
3.6.1.3	<i>Příprava pracovního roztoku 1xTBE s ethidium bromidem</i>	44
3.6.2	<i>Příprava octanového pufru</i>	44
3.6.3	<i>Příprava 2% agarózového gelu</i>	44
3.6.4	<i>Příprava 80% ethanolu</i>	44
3.6.5	<i>Příprava délkových standardů</i>	45
3.6.5.1	<i>Příprava délkového standardu 100bp</i>	45
3.6.5.2	<i>Příprava délkového standardu 20bp</i>	45
3.6.6	<i>Příprava reakční směsi pro metodu PCR</i>	45
3.6.7	<i>Průběh reakce PCR</i>	45
3.6.8	<i>Elektroforetická detekce fragmentů PCR produktů</i>	46
3.6.9	<i>Příprava vzorků pro restrikční analýzu</i>	46
3.6.10	<i>Příprava reakční směsi pro restrikční analýzu</i>	47
3.6.11	<i>Restrikční analýza PCR produktů</i>	47
3.6.12	<i>Elektroforetická detekce restrikčních fragmentů</i>	47
3.7	ALKOHOLOVÁ TOLERANCE	47
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	49
4.1	IDENTIFIKACE VINNÝCH KVASINEK IZOLOVANÝCH Z BOBULÍ A MOŠTU VINNÉ RÉVY	49
4.1.1	<i>Amplifikace kvasinkové DNA metodou PCR</i>	49
4.1.2	<i>Restrikční analýza PCR produktů</i>	51
4.1.2.1	<i>Amplikony s délkou fragmentů 880 bp</i>	51
4.1.2.2	<i>Amplikony s délkou fragmentů 750 bp</i>	52
4.1.2.3	<i>Amplikony s délkou fragmentů 620 bp</i>	52
4.1.2.4	<i>Amplikony s délkou fragmentů 390 bp</i>	53
4.1.2.5	<i>Amplikony s délkou fragmentů 450 bp</i>	54
4.2	ANALÝZA TYPOVÝCH KVASINEK	55
4.2.1	<i>Izolace DNA typových kvasinek a její amplifikace metodou PCR</i>	56
4.2.2	<i>Restrikční analýza DNA typových kvasinek</i>	56
4.2.2.1	<i>Amplikony s délkou fragmentů 550 a 500 bp</i>	56
4.2.2.2	<i>Amplikony s délkou fragmentů 650 a 660 bp</i>	57
4.2.2.3	<i>Amplikony s délkou fragmentů 880 a 800 bp</i>	58
4.3	TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ VYIZOLOVANÝCH KVASINEK	59
4.4	DENDROGRAM KVASINEK IZOLOVANÝCH Z VÍNA	61
4.5	ALKOHOLOVÁ TOLERANCE	62
4.5.1	<i>Rod Saccharomyces</i>	63
4.5.2	<i>Rod Hanseniaspora</i>	63
4.5.3	<i>Rod Pichia</i>	64
4.5.4	<i>Rod Rhodotorula</i>	66
4.5.5	<i>Rod Metschnikowia</i>	66

5	ZÁVĚR.....	68
6	LITERATURA	70
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	74
8	SEZNAM PŘÍLOH.....	75
9	PŘÍLOHY	76

1 ÚVOD

Víno se u nás produkuje od středověku, ale o metodice výroby se v historii dozvídáme pouze vzácně. Jedna z prvních zmínek je ze začátku 13. století a váže se k cisterciáckému klášteru ve Velehradě. Tamní mniši se učili vinařské praxi v Porýní a v Burgundsku a na Moravu přinesli některé nové postupy při lisování hroznů a při uchovávání vína. Víno vzniká alkoholovým kvašením, při kterém jsou přírodní cukry z hroznů révy vinné přeměňovány kvasinkami na alkohol a oxid uhličitý. Do vína přechází z hroznů mnoho chemických látek, které spolu s alkoholem a zbytky cukrů vytváří výsledný charakter vína. [1]

Kvasinky jsou mikroorganismy, které „od nepaměti slouží lidem“ při různých kvasných výrobcích. Ve vědeckém výzkumu se staly díky svým vynikajícím vlastnostem součástí modelu pro eukaryotní buňku. Mezi nejdůležitější modelové eukaryotní organismy patří druhy *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia pastoris*. Jejich hlavní průmyslový význam tkví v použití pro výrobu alkoholických nápojů, pekařského a krmného droždí. Jsou široce využívány v řadě oblastí vědy, technologie i medicíny. Některé druhy jsou nezastupitelné v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, jiné jsou využívány jako biologické modelové systémy pro studium obecných regulací metabolismu eukaryotických buněk, další působí jako faktory vyvolávající onemocnění. Z buněk kvasinek se izoluje pro komerční účely řada látek, používaných v biochemických laboratořích, např. enzymů, koenzymů, nukleotidů apod. [2,3]

Metoda PCR byla zavedena v roce 1985 a znamenala pro molekulární biologii stejný přínos jako objev restrikčních endonukleáz nebo zavedení sekvencování DNA. Tato metoda je používána v široké škále variant, které jsou upraveny podle toho, zda je potřeba amplifikovat templáty s nízkým počtem kopií, detekovat sekvenční polymorfismy, provádět molekulární identifikaci nebo typizaci organismů nebo modifikovat sekvence nukleových kyselin. Tyto varianty se navzájem liší použitím dalších enzymatických reakcí kromě amplifikace Taq DNA-polymerázou, použitím specifických sekvencí primerů, přísností podmínek pro amplifikaci a způsoby detekce produktů PCR. [4]

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

Kvasinky mají v potravinářské technologii dvojí význam. Jako technologicky využívané mikroorganismy ve fermentačním průmyslu při výrobě piva, vína, lihu, při výrobě pekařských produktů (droždí), ale i jako škůdci masa, ryb, drůbeže, výrobků studené kuchyně, mléčných produktů, fermentovaných poživatin, výrobků s vysokým obsahem cukru a dalších. [5]

2.1.1 Systematika kvasinek

Kvasinky zařazujeme do 3 skupin.

1. *Ascomycetes* - kvasinky patřící do třídy vřeckatých hub
2. *Basidiomycetes* - kvasinky rodu *Leucosporidium* a *Rhodospiridium* patřící mezi stopkovýtrusé houby
3. *Deuteromycetes* - kvasinky, u kterých nelze pozorovat pohlavní rozmnožování, a které netvoří ani balistospory. [6]

2.1.2 Morfologie kvasinek

2.1.2.1 Morfologie kvasinek

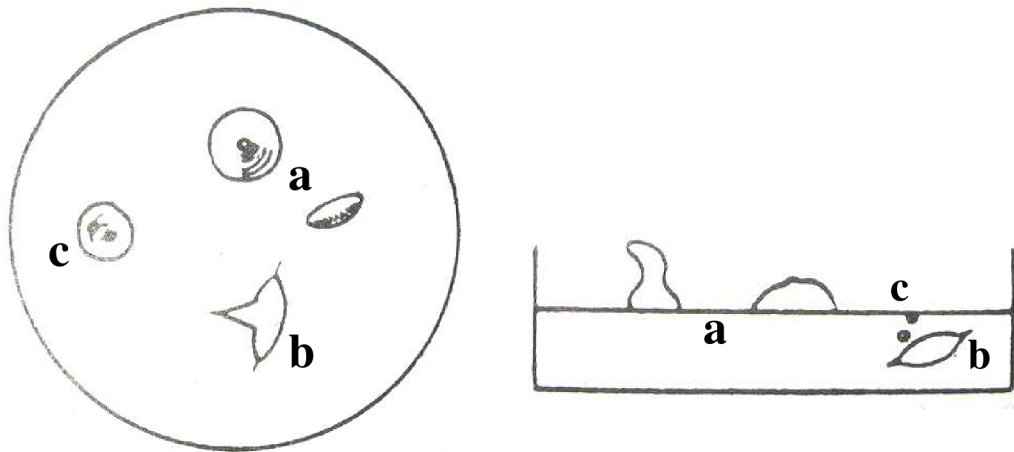
Velikost buněk kvasinek je pod hranicí viditelnosti pouhým okem, proto je vždy pozorujeme pod mikroskopem. Jejich tvary bývají rozmanité, mohou být okrouhlé, oválné, elipsoidní, protáhnuté, citronovité apod. (Obr. 1.) Přeměna tvarů buněk nastává vlivem vnějších podmínek a úzce souvisí s vlastní funkcí buňky. Základním tvarem buněk kvasinek je rotační elipsoid a odchylky ve tvarech jsou dvojího druhu: změna na kulaté tvary a změna na podlouhlé až vláknité tvary. [7, 8]



Obr. 1: Rozmanité tvary buněk kvasinek: a - kulaté, b - oválné, elipsoidní, c - citronovité, d - ogivální, e - lahvovité, f - podlouhlé, g - vláknité [9]

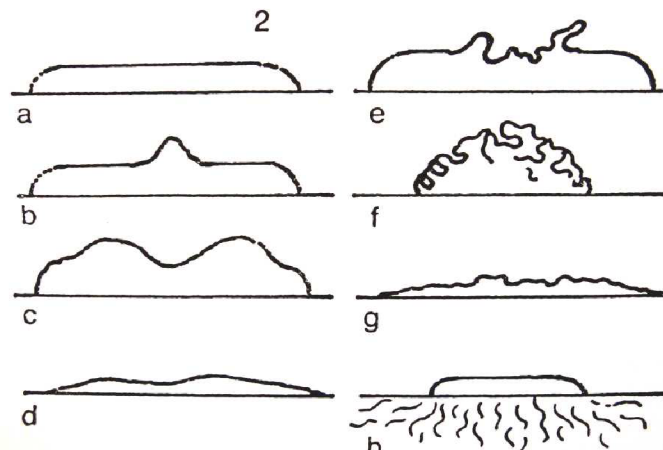
2.1.2.2 Morfologie kvasinkových kolonií

Buňky kvasinek nanesené na jedno místo na živném agaru vytvoří kolonii. Podle uložení v agarové vrstvě se rozlišují kolonie: povrchové, vnitřní a polovnitřní (Obr.2). Každá tato kolonie má jiný tvar. Povrchové kolonie mají kruhové obrysy, jsou široké a půlkulaté. Vnitřní kolonie bývají malé a čočkovité a polovnitřní kolonie bývají čočkovité, trojramenné nebo čtyřramenné. Tyto útvary polovnitřních kolonií vznikají tak, že se kolonie šíří po puklinách agaru. Pukliny tu vytvoří kolonie svojí rozpínavostí, když roste v největší blízkosti povrchu. U některých anaerobních kultur jsou časté úzké, vysoké, rohovité kolonie (např. *S. cerevisiae*). [7, 10, 11]



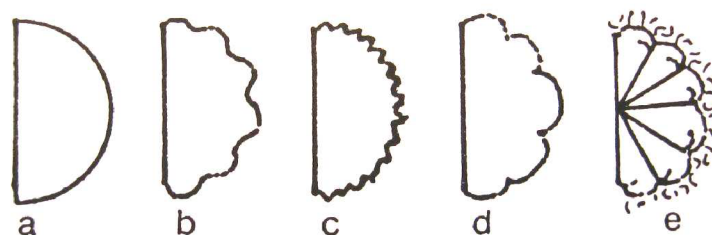
Obr. 2: Typy kolonií: a - povrchové, b - vniřtní, c - polovniřtní [11]

Povrch kolonie může být hladký, hladký s vyvýšeným středem, tzv. kupolou, nebo kráterový s prohlubeninou ve středu povrchu, příp. pokrčený s pravidelným radiálním nebo koncentrickým (soustředným) členěním. (Obr. 3) [7, 10]



Obr. 3: Povrchy kolonií: a - hladký, plochý, b - hladký s vyvýšeným středem, c - hladký, kráterový, d - plochý, e - drsný kráterový, f - vysoký, drsný, kučeravý, g - rozšířené ploché, hladké nebo moučné, h - kořínkovité [12]

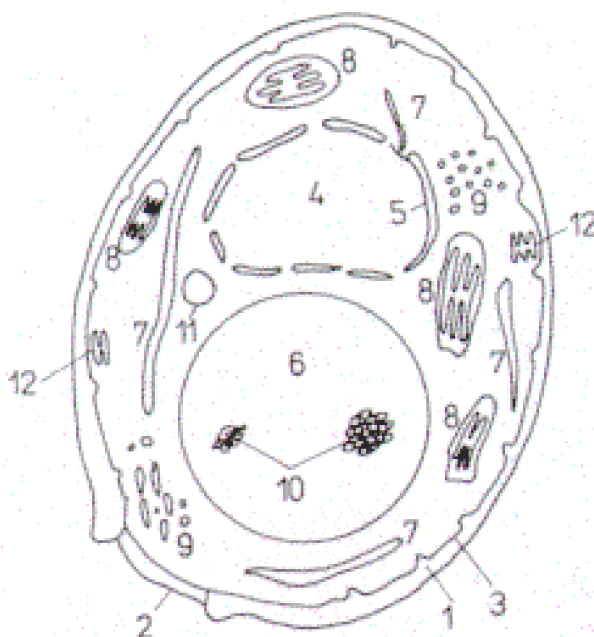
Okraj kolonií může být celistvý, lalokovitý, pilkový, čípkovitý, vlnitý nebo kořínkovitý, pokud má zřetelně vyvinuté pseudomycelium. Kolonie s hladkými a pokrčenými sektory vznikají tehdy, když je kultura schopná vytvářet hladké nebo drsné kolonie. (Obr. 4) [7, 10]



Obr. 4: Okraje kolonií:
a - rovný, ucelený, b - laločnatý, c - pilovitý, d - cípovitý, e - kořínkovitý [12]

2.1.3 Cytologie kvasinek

Pro kvasinky je charakteristická struktura eukaryotické buňky. Její povrch je obklopený silnou buněčnou stěnou, pod kterou se nachází cytoplazmatická membrána uzavírající cytoplazmu s různými strukturami, které se v ní nacházejí. Jsou to jádro, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, vakuoly, ribozómy, protoplasty a Golgiho aparát. Kromě membránových útvarů se v cytoplasmě kvasinek nacházejí i zřetelná zrníčka zásobních látek, např. volutinu (polymetafosfát), glykogenu nebo u některých druhů i tuk (např. u rodu *Rhodotorula*). (Obr. 5) [7, 8, 13]



Obr. 5: Schéma průřezu buňky kvasinky:
1 - buněčná stěna, 2 - jizva zrodu, 3 - cytoplazmatická membrána, 4 - jádro, 5 - jaderná membrána, 6 - vakuola, 7 - endoplazmatické retikulum, 8 - mitochondrie, 9 - glykogen, 10 - polymetafosfát (volutin), 11 - lipidy, 12 - Golgiho aparát [14]

2.1.3.1 Buněčná stěna

Buněčná stěna kvasinek má silnou a pevnou strukturu, která dává buňce charakteristický tvar a chrání ji před mechanickými vlivy a osmotickým šokem. Permeabilita neboli propustnost závisí na charakteru kvasinkové buňky a má na ni vliv nejen tvorba substrátu a přítomnost iontů draslíku nebo sodíku, ale i oxidačně-redukční procesy.

Hlavní složkou buněčné stěny kvasinek jsou polysacharidy, které představují až 80 % sušiny stěny. Polysacharidy mají strukturu vláken, která tvoří hustou spleť, vyplněnou bílkovinami, které představují 6-10 % sušiny stěny. Ve stěně kvasinek je také přítomno malé množství lipidů a fosfolipidů (3-10 %). Stěny obsahují také fosforečnany vázané esterovými vazbami na polysacharidy, které dávají buňkám kvasinek negativní náboj.

Na povrchu stěny kvasinek jsou patrné jizvy po pučení, které se v elektronovém mikroskopu jeví jako mírně vyvýšené prstence. Na jednom pólu každé buňky můžeme spatřit zvláštní jizvu, která zůstala v místě dřívějšího spojení dceřiné buňky s mateřskou buňkou. Této jizvě se říká jizva zrodu. [8, 14]

2.1.3.2 Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána ohraničuje celou buňku a má tři hlavní funkce. Tvoří elastický obal a ochrannou bariéru na povrchu buňky, kontroluje vstup a výstup látek do buňky a z buňky a je místem, kde se odehrává biosyntéza některých komponentů buněčné stěny a vnějších obalů. Je poměrně tenká, složená z lipidů a proteinů a vytváří četné vychlípeniny vybíhající do cytoplazmy. Je volně propustná pouze pro malé molekuly bez náboje, a tvoří proto osmotické rozhraní mezi buňkou a vnějším prostředím. Membrána obsahuje některé hydrolytické enzymy a enzymy související se syntézou složek buněčné stěny (např. glukansyntasu). Neprobíhají zde oxidační procesy. Cytoplazmatická membrána má silnou aktivitu ATPázy, což se projeví i na nitrobuňčných membránách. [7, 14]

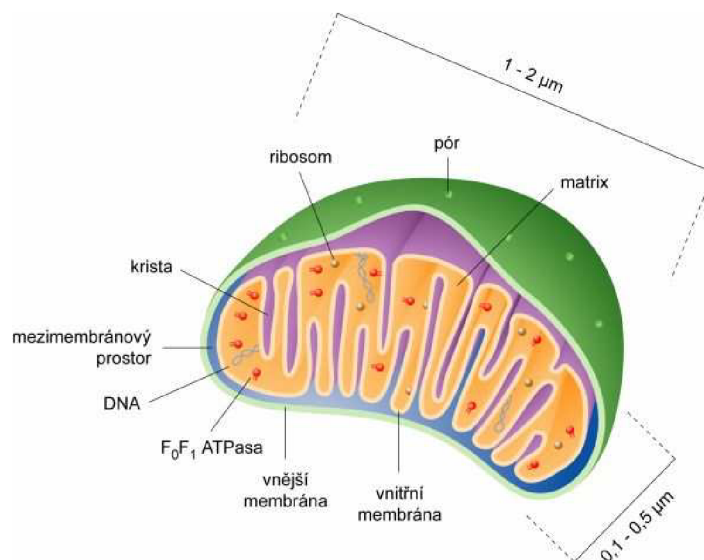
2.1.3.3 Cytoplazma

Cytoplazma kvasinek obsahuje systém dvojitých membrán, které se podobně jako u rostlin a živočichů nazývá endoplazmatické retikulum. Obě tyto membrány mají poměrně velké póry a vzhledově připomínají membránu jádra. Na vnějším povrchu obou membrán jsou četná zrníčka polynomů, tj. agregátů ribozomů, v nichž se syntetizují bílkoviny. Endoplazmatické retikulum tvoří v buňce různé nádobky a oddělení, obsahující různé enzymy a rezervní látky. [7, 14]

2.1.3.4 Mitochondrie

Mitochondrie (Obr. 6) jsou přítomné v cytoplazmě kvasinek a jsou to strukturální útvary velmi rozmanitého tvaru (kulovité, válcovité až vláknité nebo laločnaté). Mitochondrie též buňky se obvykle liší tvarem i velikostí. Jsou obklopeny dvěma membránami - vnější a vnitřní. Vnější membrána má bradavičnatý povrch a vnitřní membrána tvoří hluboké vchlípeniny směrem dovnitř mitochondrie, kterým se říká kristy.

Mitochondrie jsou složeny z bílkovin, lipidů a fosfolipidů. Obsahují také RNA a malé množství DNA, která je nositelem mimojaderné dědičnosti kvasinek. Jsou také sídlem dýchacích enzymů a systému oxidační fosforylace. V mitochondriích probíhá i syntéza některých mitochondriálních bílkovin, proto jsou zde přítomny také tRNA, mRNA a ribozómy. [14]



Obr. 6: Průřez organely mitochondrie [15]

2.1.3.5 Ribozómy

Ribozómy jsou globulární organely v průměru 20 – 30 nm velké, složené z malé a velké podjednotky. Ribozómy mohou být volné nebo vázané na membrány endoplasmatického retikula. Bílkoviny tvoří převážně 57 % hmot. ribozómu a poměr bílkovin a RNA v nich není jednotný. [7]

2.1.3.6 Vakuola

Vakuola je velmi nápadná a důležitá organela v buňkách kvasinek. Je to většinou kulovitý útvar obklopený jednoduchou membránou, která často vysílá úzké výběžky do cytoplazmy. Nejčastěji bývá v buňce jedna velká (pokud je buňka zralá klidová) a několik malých (u mladých nebo pučících buněk). Ve vakuolách se nacházejí enzymy hydrolázy, většina proteáz, ribonukleázy, estrázy. Tyto enzymy rozkládají funkčně narušené organely, např. mitochondrie. Vakuoly obsahují také polyfosfáty a velkou zásobu draselných iontů, aminokyselin a purinů. Jsou tedy rezervoárem látek, které se zrovna neúčastní metabolismu. [7, 14]

2.1.3.7 Golgiho aparát

Golgiho aparát je dalším membránovým útvarům v cytoplazmě a nachází se pouze v eukaryotických buňkách. Má tvar plochého měchýřku nebo několika propojených plochých měchýřků nebo cisteren uložených rovnoběžně vedle sebe. Předpokládanou funkcí Golgiho aparátu je transport prekurzorů buněčné stěny z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu. [7, 14]

2.1.3.8 Jádru

Buněčné jádro je kulatá až laločnatá organela nacházející se ve středu buňky nebo uložené excentricky. Je od cytoplazmy odděleno dvojitou jadernou membránou s velkými póry. Rozlišení chromozomů v jádře kvasinek je i pomocí elektronové mikroskopie velmi obtížné.

Počet chromozomů je proto odvozován z výsledků genetických studií. U nejlépe prostudované kvasinky (*Saccharomaces cerevisiae*) bylo až dosud zjištěno 16 chromozomů v haploidním jádře.

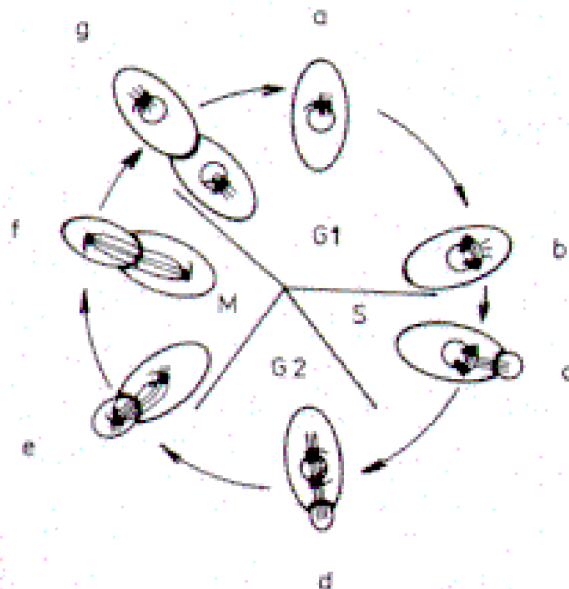
V jádru kvasinek je také jadérko srpkovitého tvaru, které je uloženo těsně pod jadernou membránou. Dále je zde zřetelné pólové tělísko vřeténka, které má tvar disku a vycházejí z něj vlákna zvaná mikrotubuly. Mikrotubuly jsou složeny z bílkoviny tubulinu a spolu s tělískem hrají důležitou roli při dělení jádra během rozmnožování buněk. [7, 14]

2.1.4 Rozmnožování kvasinek

Kvasinky rostou převážně v koloniích z jednotlivých buněk s průměrem 5-10 μm . Množí se vegetativně pučením a pohlavně tvorbou askospor. Mnohé kvasinky jsou schopné tvořit septované mycelium, pseudomycelium nebo klíčkové hyfy. Mohou se také od mateřské buňky oddělit.

2.1.4.1 Pohlavní rozmnožování

Pohlavní rozmnožování (Obr. 7) je známé u kvasinek řadících se do skupin *Ascomycetes* a *Basidiomycetes* souhrnně nazývanými jako teleomorfní kvasinky. Při pohlavním rozmnožování vznikne po redukčním dělení z diploidní buňky askus s haploidními askosporami. Askospory (gamety) potom kopulují, čímž po karyogamii vznikne diploidní zygota a z ní askus nebo basidium. V asku se vytváří askospory (endospory) a na basidiu basidiospory (exospory). Aby celý tento proces mohl proběhnout, musí nejprve vzniknout pohlavní aglutinace buněk, která nastává při smíchání dvou kultur kvasinek opozitních párovacích typů. [5, 7]

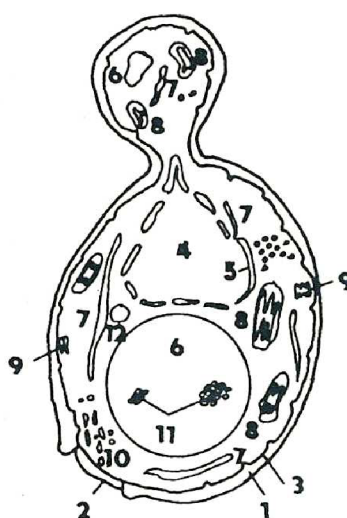


Obr. 7: Schéma cyklu buněčného dělení *Saccharomyces cerevisiae*:

S - syntéza DNA, *M* - mitóza, *G1* - v buňce je jeden genom, *G2* - buňka obsahuje zdvojený genom, *a* - klidová buňka, *b* - zdvojení polárního tělíska, *c* - syntéza DNA, vznik malého pupenu, *d* - separace polárních tělísek a vznik vřeténka, *e, f* - migrace jádra do pupenu a dělení jádra (mitóza), *g* - vznik dvou samostatných jader, oddělení obou buněk [14]

2.1.4.2 Vegetativní rozmnožování

Většina rodů kvasinek se vegetativně rozmnožuje pučením. Při pučení je vznikající malá dceřiná buňka - pupen - spojena kanálkem s mateřskou buňkou (Obr. 8). Před pučením dochází ke splývání blan endoplazmatického retikula a pak k jeho dělení. Dále dochází také k opakovanému dělení vakuol a ke změně tvaru mitochondrií v dlouze protáhlé. Po počátku tvorby pupenu do něho vstupují drobné vakuoly a mitochondrie. Současně začne mitotické dělení jádra a jeho migrace k pupenu. S jádrem přecházejí do nově vytvořeného pupenu také další složky cytoplazmy. Pak se cytoplazmatickou membránou uzavře kanálek mezi mateřskou a dceřinou buňkou a v pupenu se intenzivně syntetizuje a rozšiřuje endoplazmatické retikulum. Po vytvoření buněčné stěny mezi mateřskou a dceřinou buňkou, vzrůstu velikosti pupenu a spojení drobných vakuol ve vakuolu jedinou je pučení ukončeno. [7, 8, 14]



Obr. 8: Schéma průřezu pučící buňky kvasinky:

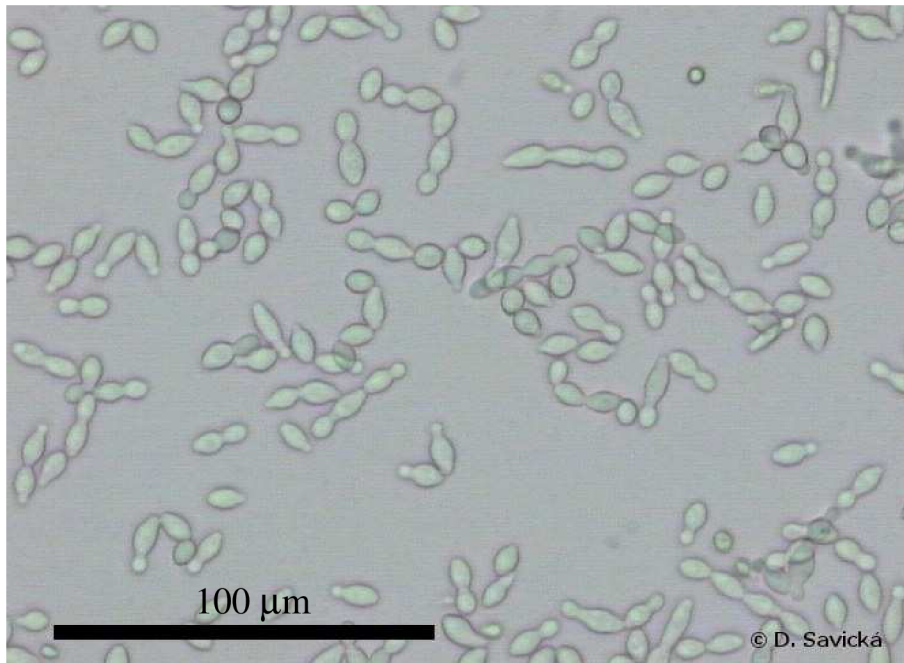
1 - buněčná stěna, 2 - jizva, 3 - cytoplazmatická membrána, 4 - jádro, 5 - jaderná membrána s póry, 6 - vakuola, 7 - endoplazmatické retikulum, 8 - mitochondrie, 9 - Golgiho aparát, 10 - glykogen, 11 - polymetafosfát (volutin), 12 - lipidy [11]

2.1.5 Potravinářsky významné kvasinky

2.1.5.1 Rod *Saccharomyces*

Tento rod se rozmnožuje bipolárním pučením na tzv. široké základně, kdy pupen budoucí kvasinky je spojen s mateřskou buňkou širokým krčkem a kvasinky mohou pučet na obou koncích buňky i ve stejnou dobu. Po pučení se na krčku tvoří přepážka připomínající dělení buněk. Při pohlavním rozmnožování se vytváří asky se 4 kulovitými sporami, které se po vyklíčení ihned spojují, proto u nich nelze hovořit o haploidní vegetativní fázi. Někdy se stane, že spolu kopulují ještě ve vřecku. Buňky této kvasinky jsou dlouhé a mají citrónovitý až paličkovitý tvar. Rod *Saccharomyces* (Obr. 9) zkvašuje sacharózu a neutilizuje nitrát. [5, 16]

Druh *Saccharomyces* Hansen vytváří velké diploidní citrónkovité apikulární (na koncích mají malý výběžek) nebo prodloužené buňky, které se rozmnožují vegetativně holoblastickým průběžným pučením. Spóry jsou kulaté s hladkou stěnou a někdy na nich můžeme pozorovat krátký lem. V kapalném prostředí se tvoří usazenina a prsteneček. [6, 17]



Obr. 9: Mikroskopický snímek kvasinky druhu *Schizosaccharomyces ludwigii* [18]

2.1.5.2 Rod *Hanseniaspora*

Rod *Hanseniaspora* zkvašuje sacharidy (glukózu) a účastní se rozkvašování moštu. Buňky jsou malé, citrónovité, apikulární, oválné až protažené, pučí holoblasticky (pučení se účastní všechny vrstvy buněčné stěny mateřské buňky). Zpravidla se vytváří dobře vyvinuté pseudomycelium, jen někdy rudimentární (zárodečné) pseudomycelium. [5, 6, 17]

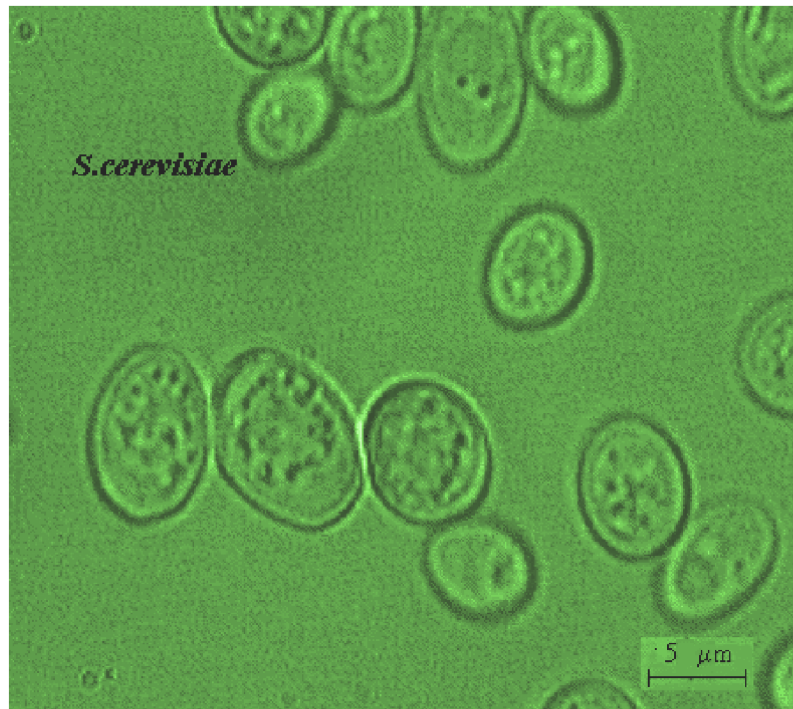
Hanseniaspora vytváří tři typy askospór:

- kloboukovité nebo helmovité - 2-4 v asku, které se ve zralosti z asků uvolňují
- kulaté s hladkou nebo bradavičnatou stěnou a ekvatoriálním lemlem
- kulaté s bradavičnatou stěnou.

Kulaté askospóry se ve zralosti z asků neuvolňují. [6]

2.1.5.3 Rod *Saccharomyces*

Rod *Saccharomyces* (Obr. 10) patří k nejznámějším a nejprozkoumanějším kvasinkám. Jejich buňky mají kulatý, elipsoidní nebo cylindrický tvar. Kvasinky se rozmnožují vegetativním multilaterálním (mnohostranným) pučením a vegetativní stadium je až na výjimky diploidní. Mezi buňkami dochází také ke konjugaci, jejímž výsledkem je tvorba spor s hladkým povrchem v počtu 1-4 v jednom vřecku. Rod může také tvořit pseudomycelium. Tyto kvasinky zkvašují sacharidy, nevytváří amylózovou substanci a neutilizují nitrát. [5, 6, 16] Do konce 19. století bylo popsáno mnoho druhů rodu *Saccharomyces*, které však z dnešního hlediska nevyhovovaly požadavkům na druh a spíše by se definovaly jako subspecie (variety). [16]



Obr. 10: Mikroskopický snímek kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae* [19]

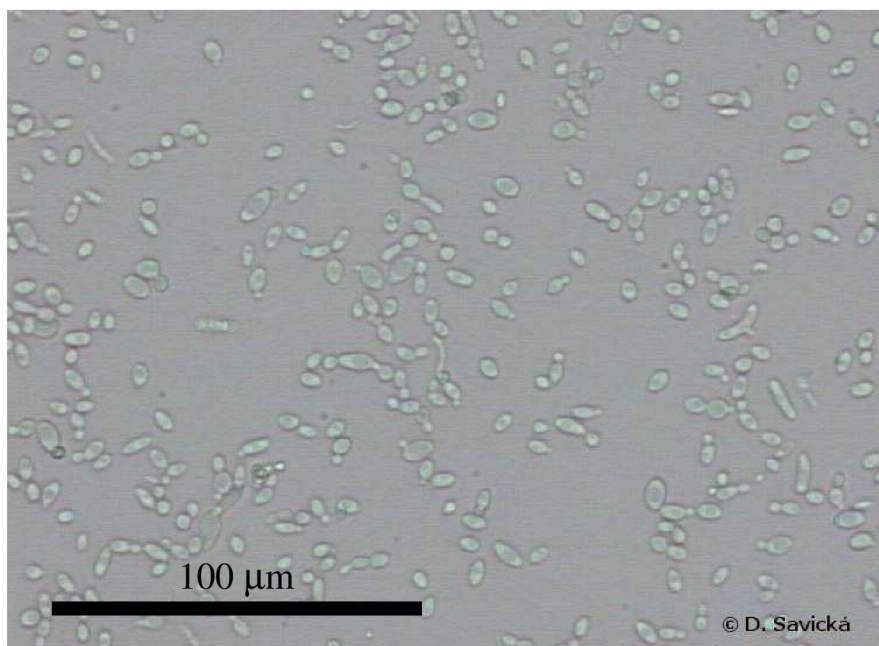
2.1.5.4 Rod *Pichia*

Buňky rodu *Pichia* jsou kulaté, elipsoidní, protáhnuté a někdy mohou být i zahrocené, ale nejsou ogivální. Kvasinky se rozmnožují pohlavním multilaterálním pučením, přičemž některé druhy mohou tvořit artrokonidie a mohou se také vyskytovat pseudohyfy a v omezeném množství i pravé hyfy. V ascích se vytváří 1-4 askospóry, které jsou kloboukovité, půlkulaté, kulaté s hladkou stěnou i saturnovité. Asky se všeobecně vyprazdňují, ale mohou i přetrvávat. Kvasinky rodu *Pichia* taktéž mohou zkvašovat sacharidy. Tyto kvasinky mohou kontaminovat pivo, víno, ovocné šťávy, výrobky studené kuchyně i kysané zelí, kdy se na povrchu tekutin tvoří vzlínavá blanka zvaná křís, pokožka nebo mázdra. [5, 6, 16]

2.1.5.5 Rod *Kluyveromyces*

Druhy rodu *Kluyveromyces* (Obr. 11) se původně zařazovaly do rodu *Saccharomyces*. Podrobnějším zkoumáním se však dokázalo, že rod *Saccharomyces* je velmi heterogenní. Proto se některé druhy, které se odlišovaly morfologicky a fyziologicky, oddělily do nového rodu *Kluyveromyces*. [6]

Do tohoto rodu se zahrnují druhy s vegetativními elipsoidními, válečkovitými až protáhnutými buňkami, které se rozmnožují pučením. Za určitých podmínek se mohou v kultuře vyvinout i vřeska, v nichž se nacházejí 1-4 spory, které se po uvolnění shlukují. Patří sem druhy, které jsou schopné zkvašovat sacharidy. [5, 6, 16]



Obr. 11: Mikroskopický snímek kvasinky druhu *Kluyveromyces marxianus* [18]

2.1.5.6 Rod *Candida*

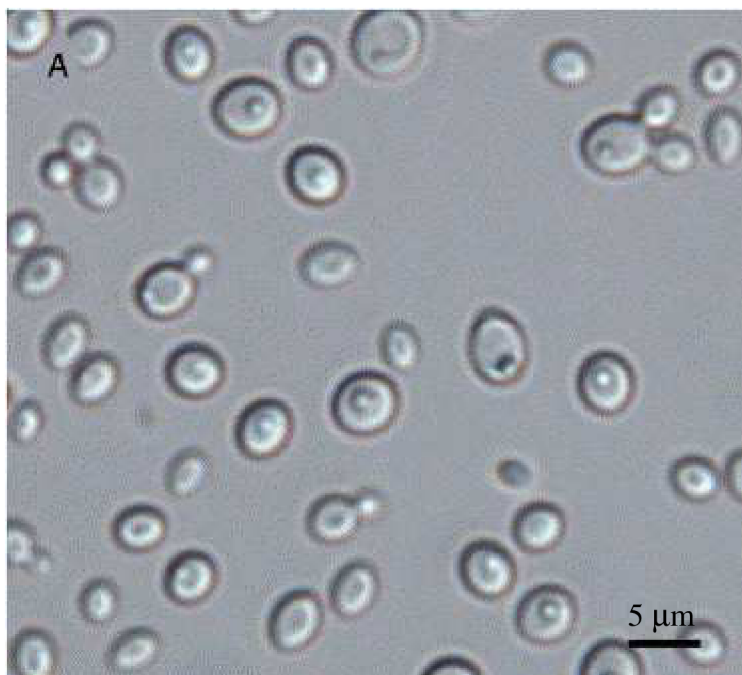
Rod *Candida* je velmi rozsáhlý a zahrnuje druhy jak čistě saprofytické, tak i potenciálně patogenní, které mohou způsobit mykotická onemocnění člověka i zvířat. Avšak některé druhy tohoto rodu slouží k přípravě krmného droždí, např. *Candida albicans*.

Kvasinky tohoto rodu mají rozmanité tvary buněk, jako např. kulatý, elipsovité, cylindrický, protáhlý, apikulární, agovální, hranatý, lahvovitý apod. Rod se rozmnožuje multilaterálním pučením a původně se vyznačoval tvorbou rudimentárního, větveného nebo diferencovaného pseudomycelia a blastokonídiemi. Druhy rodu *Candida* mohou vytvářet chlamydospóry, ale askospóry, letiospóry, balistokonídie ani artokonídie netvoří. Některé druhy zkvašují sacharidy. [5, 6, 16]

2.1.5.7 Rod *Metschnikowia*

U těchto kvasinek se vyskytuje multilaterální pučení a také tvorba rudimentárního pseudomycelia. Jehlicovité askospóry se vyvíjejí po 1-2 ve vřecku. Buňky rodu *Metschnikowia* (Obr. 12) jsou kulaté, elipsoidní, hruškovité, válečkovité i srpkovité. Doposud bylo vyizolováno 6 druhů kvasinek, které se nacházejí v půdě, ve vodním prostředí a jako parazité na bezobratlých živočiších. [6, 16]

Druh *Metschnikowia pulcherrima* se rozmnožuje pučením a někdy tvoří skromné pseudomycelium. Čerstvé izoláty této kvasinky často tvoří purpurovočervené kolonie způsobené barvivem pulcherimin. Druh slabě fermentuje sacharidy a vyskytuje se na ovoci a v ovocných šťávách. [5]



Obr. 12: Mikroskopický snímek kvasinky druhu *Metschnikowia andauensis* [20]

2.1.5.8 Rod *Zygosaccharomyces*

Tento rod je nejvýznamnějším zástupcem osmotolerantních kvasinek. Morfologicky jsou podobné rodu *Saccharomyces*. Vegetativní buňky se rozmnožují multilaterálním pučením, jsou kulaté, elipsoidní nebo cylindrické. Rod může tvořit pseudomycelium, ale pravé hyfy netvoří. Mezi jednotlivými buňkami těchto kvasinek nastává konjugace nebo somatogamní autogamie. Vzniklé askospóry jsou hladké, kulaté nebo mírně elipsoidní, po 1-4 v asku, které přetrvávají. Kvasinky zkvašují sacharidy, ale netvoří amylázovou substanci. [5, 6]

2.1.5.9 Rod *Rhodotorula*

Rod (Obr. 13) patří mezi kvasinky, které nezksvašují žádný cukr. Mají značně vyvinutý pentózový cyklus k využívání glukózy, tedy na její přímou oxidaci. Kvasinky mají oranžovou až červenou barvu, protože obsahují karotenoidní barviva. Tyto barviva je chrání před účinkem ultrafialové složky slunečního záření, proto se mohou ve větším množství vyskytovat v ovzduší. Dále se mohou vyskytovat např. na kůži člověka a zvířat, ve vlasech, na povrchu i uvnitř potravin. Ve víně mohou někdy tvořit sliz a v kapalných substrátech nejčastěji sedimentují a tvoří prstence. Buňky kvasinek mají kulovitý až krátce oválný tvar a jejich velikost je asi 2-5 μm . Na sladidovém agaru vyrůstají v růžových až červených koloniích, které jsou vyklenuté, lesklé, hladké, slizovité. [5, 16, 21]



Obr. 13: Mikroskopický snímek kvasinky druhu *Rhodotorula glutinis* [19]

2.1.5.10 Rod *Schizosaccharomyces*

Rod *Schizosaccharomyces* je jediným rodem, který se rozmnožuje přehrádečným dělením jako bakterie. Buňky této kvasinky se vyznačují obdélníkovými tvary, netvoří mycelium, ale charakteristická je tvorba askospor (1-8 v asku). Jde tedy o askosporogenní kvasinky. Vyznačují se silnou fermentační schopností. Vyskytují se v marmeládách, melase, hroznové šťávě apod. [5, 16]

Druh *Schizosaccharomyces pombe* se rozmnožuje schizotomním rozpadem na 4-8 dceřinných buněk. Tento druh se používal jako modelový mikroorganismus pro genetické studie. Pomocí této kvasinky se také může biologickou cestou stanovit inositol a vitamíny skupiny B. Použití nachází také ve vinařství, a to k odkyselování vín, protože dovede využívat přítomnou kyselinu jablečnou a vinnou. [16]

2.1.6 Fermentační procesy

2.1.6.1 Alkoholová fermentace

Alkoholového kvašení se využívá především ve vinařství, pivovarnictví, lihovarnictví a pekařství. Původci tohoto kvašení jsou především kvasinky rodů *Saccharomyces* a *Torula*, některé druhy mikroskopických hub (rod *Mucor*) a ojedinělé druhy bakterií.

Hlavním původcem alkoholového kvašení ovocných šťáv jsou právě kvasinky *Saccharomyces ellipsoideus*, které energeticky zkvašují glukózu, fruktózu, sacharózu a maltózu. Při alkoholovém kvašení vznikají z jedné molekuly hexózy dvě molekuly ethanolu a dvě molekuly CO₂ za současného vzniku energie (2 ATP). Na začátku kvašení, když je ještě v prostředí nedostatek acetaldehydu, vzniká určité množství glycerolu.



Při průmyslovém alkoholovém kvašení vznikají kromě ethanolu a malého množství glycerolu ještě další vedlejší produkty, které se vyskytují v poměrně nízkých koncentracích, ale mají velmi velký technologický význam. Především jsou to vyšší jednosytné alkoholy (propanol, butanol, pentanol), které vznikají z aminokyselin odumřelých kvasinkových buněk (přiboudliny). Po dobu kvašení, ale hlavně po dobu zrání hotových alkoholických nápojů vznikají estery, které jsou nežádoucí v pivovarnictví, ale ve vinařství mají pozitivní význam - tvoří buket vína. Z pyruvátu, který vzniká v procesu glykolýzy, se při alkoholovém kvašení tvoří malé množství dalších fermentačních produktů, které už v malém množství nepříznivě ovlivňují chuť hotového výrobku. Jde především o biacetyl, který vzniká kondenzací acetaldehydu s pyruvátem na acetylmléčnou kyselinu a potom jeho samovolným oxidačním rozkladem. [22, 23, 24, 25]

2.1.6.2 Spontánní fermentace

Při spontánním kvašení se do moštu kromě šíření nijak nezasahuje. Spontánní kvašení může probíhat jen v moštech ze zdravých hroznů. Důležitým činitelem je dostatečné množství kulturních kvasinek, pokud by se totiž hrozny sbíraly za deště nebo po něm, spontánní kvašení by probíhalo pomalu a obtížně. Pokud jsou hrozny zdravé a vylisovaný mošt obsahuje potřebné množství kulturních kvasinek, probíhá spontánní kvašení i v moštech s vysokým obsahem cukru.

Spontánní kvasný proces zahajují vždy apikulátní kvasinky (*Kloeckera apiculata*), které zkvašují glukózu a fruktózu. Ve zkvašovaném moštu jich je až 90 % a víno dokáže zkvasit až na 5-6 obj. % ethanolu. Kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae*, které potlačují apikulátní kvasinky při koncentraci ethanolu 3 obj. %, jsou více odolné vůči ethanolu a rozmnožují se a kvasí i při nedostatku kyslíku.

Mošty z nezdravých hroznů jsou náchylné především na nežádoucí mléčné, manitové nebo octové kvašení. Je to způsobeno tím, že apikulátní kvasinky prokvasí víno do max. 5 obj. % ethanolu a potom jejich činnost ustane. Pokud je v moštu málo kulturních kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*), mošt dále nekvasí a začínají působit bakterie mléčného nebo octového kvašení, které tento proces znehodnotí. [22, 26, 27]

2.2 Vinařství

Vinařství je potravinářské výrobní odvětví zabývající se zpracováním vinné révy. Technologicky navazuje na vinohradnictví, obor rostlinné zemědělské výroby, které se zabývá pěstováním stolních odrůd révy vinné, určených k přímé spotřebě a moštových odrůd révy vinné, určených k výrobě hroznových vín. [28]

Podle odrůd se víno rozděluje do tří jakostních tříd. [8]

- I.A třída - patří sem výběrové odrůdy hroznů, jako Burgundské bílé, Burgundské šedé, Burgundské modré, Muškát otonel, Muškát žlutý, Ryzlink rýnský, Tramín, Sauvignon, Semillon a v tokajské oblasti Furmint a Lihovina.
- I.B třída - obsahuje velmi kvalitní a rozšířené odrůdy, které se pěstují ve velkých množstvích, jako Ryzlink vlašský, Veltlínské zelené, Sylvánské zelené, Sylvánské červené, Neuburské, Müller-Thurgau, a z modrých odrůd Frankovka a Svatovavřínecké.
- II. třída - zahrnuje odrůdy Veltlínské červenobílé, Veltlínské červené, Bouvierův hrozen, Čabaňská perla, Ezerjó a Medovec.
- III. třída - zahrnuje odrůdy, které se předávají jako stolové hrozny, např. Chrupka (ušlechtilé), Bratislavské bílé, Irsay, Olivek, Kadarka bílá a červená. [8, 28]

2.2.1 Hrozny vinné révy

Hrozny vinné révy se skládají z třapin se stopkami, které tvoří hlavní nosnou kostru hroznu a z bobulí různé velikosti, barvy a tvaru. Bobule tvořící přes 95 % hmotnosti hroznu se skládají z dužniny, semen a slupek. Třapina tvoří 3 - 4 % hmotnosti hroznů. Před dosažením optimální technologické zralosti je zelená, pak dřevnatí a hnědne. Ze zelené nevyzrálé třapiny se do moštu mohou uvolňovat třísloviny a chlorofyl, které mohou poškodit senzorycké vlastnosti vína. Nejdůležitější chemickou složkou bobulí hroznů jsou cukry a organické kyseliny. Obsah cukru se pohybuje od 10 do 24 % a je závislý nejen na odrůdě (kultivaru), ale i na klimatických a půdních podmínkách daného ročníku a jeho zralosti. Přítomný cukr je tvořen převážně z glukosy a fruktosy ve stejném množství. Z organických kyselin převládá v dužnině hroznů kyselina vinná, dále kyselina jablečná a kyselina citrónová. Dalšími chemickými složkami hroznů jsou třísloviny, tuky, dusíkaté látky, minerální látky a aromatické látky. Chemické složení a chuťové vlastnosti hroznů a zejména dužniny mají rozhodující vliv na kvalitu vyráběného vína. [28, 29]

2.2.2 Technologické kroky výroby bílého vína

2.2.2.1 Přejímka hroznů

Sklizené hrozny se dopravují do zpracovatelských závodů k přejímce hroznů v různých obalech (přepravky, kádě, sudy, nákladní vozy) podle místních zvyklostí. Při skládce hroznů se zjišťuje hmotnost. [28]

Dále se při přejímce stanovuje průměrná cukernatost a jakost podle zdravotního stavu odrůdy a obsahu cukru. K zjišťování cukernatosti slouží speciální moštoměry. V automatizovaných linkách se cukernatost zjišťuje zpravidla refraktometricky. [28, 30]

2.2.2.2 Získávání moštu z hroznů

K získání kvalitního čistého moštu požadované jakosti se hrozny zpracovávají různými operacemi, jako je mlýnkování, odzrňování, scezování a lisování. Mlýnkování slouží k rozdrčení bobulí a provzdušnění drtě. Dělá se různými typy mlýnků - válcovými, bubnovými, kladívkovými a odstředivými. Nejrozšířenější jsou válcové mlýnky. Při použití některých typů odzrňovačů a lisů se mlýnkování nemusí dělat. Čím lépe se bobule rozdrťí, tím je vyšší výtěžek moštu. Rozemleté hrozny s třapinami nebo i po odzrňování se nazývají rmut. [30]

- Odzrňování - slouží k odstranění třapin z rmutu, aby do moštu nepřecházely nežádoucí látky. Odzrňování se dělá na různých typech vystíracích či odstředivkových odzrňovačů, v nichž se v perforovaném válci zachycují třapiny, kdežto rmut jím protéká do sběrné nádrže. Stroje, které umožňují mlýnkování a odzrňování najednou se nazývají mlýnkoodzrňovače, též agrapumpy nebo fulograpy. [30]
- Scezování - může být samostatnou technologickou operací nebo je součástí lisovacího procesu. Slouží k oddělení nejkvalitnější části moštu, která se nazývá samotok. Provádí se ihned po předchozí operaci, aby se předešlo okysličení moštu a jeho obohacení tříslovinami vyluhujícími se z třapin.
- Lisování - má za účel oddělení šťávy, která byla uvolněna z buněk předchozími technologickými operacemi. Používají se periodické i kontinuální lisy, hydraulické i pneumatické lisy. U periodických lisů se po naplnění násypného

prostoru lisuje rmut hydraulickým nebo šroubovým tlačným zařízením. Vylisovaný mošt vytéká z lisu do nádrže (Obr. 14). Lisuje se pozvolna s občasným přerušením, aby výtěžek moštu byl co největší. Při použití vysokovýkonných kontinuálních lisů se do moštu může dostat následkem většího tlaku více nečistot, což snižuje kvalitu vína. Rmut ze světlých hroznů pro výrobu bílého vína se lisuje ihned. Při zpracování silně aromatických světlých i při zpracování modrých hroznů a při výrobě červených vín se před lisováním rmut nakvašuje. Bílé odrůdy se nakvašují obvykle 1 den, červené odrůdy 4 - 14 dní podle požadovaného charakteru vyráběného vína. Nejčastěji se nakvašuje při teplotě 20 - 25 °C v závislosti na zpracovávané odrůdě. U moderních výrobních linek se nakvašuje kontinuálně pod tlakem oxidu uhličitého. [28, 30]



Obr. 14: Lisování rmutu

2.2.2.3 Úprava moštu

K dosažení optimální kvality moštu je třeba mošt získaný lisováním dodatečně upravovat. V praxi se provádí odkalování, provzdušňování, síření, odkyselování, okyselování a úprava cukernatosti moštu. [28, 30]

- Odkalování - slouží k oddělení hrubých kalů a nečistot, s nimiž se částečně strhávají i kontaminující mikroorganismy. [28, 30]
- Provzdušňování - se dělá u zdravých moštů skladovaných v nepropustných tancích a nádržích. Prosycení moštu kyslíkem je nezbytným předpokladem dobré činnosti kvasinek.
- Síření - slouží k ochraně moštů před bakteriální a plísňovou kontaminací, před oxidací a před jinými vadami. Síří se oxidem siřičitým dávkou 25 - 50 mg/l. V praxi se síří všechny mošty, aby se předešlo chorobám a vadám vína. Oxid siřičitý potlačuje činnost nežádoucích mikroorganismů, zejména bakterií a divokých kvasinek a současně příznivě ovlivňuje sensorický charakter následného vína podporou tvorby glycerolu. [28, 30]

- Odkyselování - má za účel snížení kyselosti moštů s nízkým obsahem cukru. Odkyseluje se buď čistým vápencem, který váže kyselinu vinnou, nebo průtokem přes vrstvu anexu, popř. míšením kyselých moštů s méně kyselými. [28, 30]
- Okyselování - se provádí u moštů s nízkým obsahem kyselin. Přidává se kyselina vinná v množství 1 - 2 g/l tak, aby celková kyselost byla 7 - 8 g/l.
- Úprava cukernatosti - pokud mošty obsahují málo cukru a hodně kyselin, upravuje se cukernatost. Při úpravě cukernatosti je třeba postupovat opatrně, aby se přílišným přislazením nezměnil odrůdový charakter vína. [28, 30]

2.2.2.4 Kvašení moštu

Biochemické procesy, které probíhají v moštu a ve víně, mohou být aerobní nebo anaerobní. K aerobním přeměnám cukru a dále kyseliny pyrohroznové patří dýchání kvasinek. Anaerobním kvašením je alkoholové kvašení, při kterém se jednoduché cukry mění na ethanol a oxid uhličitý. Po dobu kvasného procesu se bílkoviny ve víně rozkládají působením proteolytických enzymů a vzniklé aminokyseliny se deaminují. [23]

Kvasinky nejlépe kvasí při 20 - 30°C. Z hlediska úniku vonných látek z vína jsou tyto teploty nevhodné a měli bychom řídit kvasný proces tak, aby teplota moštu nepřestoupila 20°C. Toho dosáhneme větráním kvasírny v noci, odkalením a přistřením moštu a aktivním chlazením kvasícího moštu. [29]

Ve vinařství se používají kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (synonyma *Saccharomyces vini*, *Saccharomyces ellipsoideus*), které mají vyšší toleranci k ethanolu. Dříve se využívalo především spontánní kvašení způsobené kvasinkami ulpěnými na povrchu hroznů. Dnes se používá i čisté, neboli řízené kvašení. [28, 30, 31]

Zákvas se připravuje v množství 1 % veškerého moštu namnožením vhodné kultury vinných kvasinek v malém podílu sterilního moštu. Silně sířené mošty se zakvašují kvasinkami adaptovanými na oxid siřičitý. Kvašení probíhá ve vertikálních či horizontálních tancích a má tři fáze (Obr. 5.).

1. Začátek kvašení - je charakteristický pozvolným rozmnožováním kvasinek, pomalým začátkem prokvašování cukrů moštu a trvá 2 - 3 dny.
2. Bouřlivé kvašení - nastává třetí až čtvrtý den a projevuje se vývinem tepla, zvýšením teploty až nad 25 °C a uvolňováním oxidu uhličitého, který strhává i aromatické a těkavé buketní látky. V této fázi kvašení se musí regulovat teplota v rozmezí 15 - 18 °C a u chladnomilných kultur kvasinek v rozmezí 10 - 12 °C. Bouřlivé kvašení trvá několik dnů až týdnů. Kvašení při nižších teplotách trvá déle, ale vyrobená vína jsou kvalitnější.
3. Dokvašování - je poslední fáze kvašení, která nastává po poklesu obsahu cukru na 2 - 5 g/l a trvá 1 - 2 měsíce, někdy i půl roku. Činnost kvasinek se postupně omezuje, až zcela ustane. Po ukončení kvašení a zastavení vývinu oxidu uhličitého začnou kvasinky sedimentovat na dno tanku a usazují se i kaly. Víno se pozvolna samovolně čistí. Čištění vína lze urychlit čiřením. Dokvašené víno se odděluje od sedimentu kalů a kvasinek stáčením do čistých zasířených kvasných tanků (Obr. 15). Při prvním stáčení se víno obvykle provzdušní a nastane další vysrážení

kalů, především tríslobílkovinných. Proto se po 6 - 8 týdnech víno stáčí znovu. Víno po ukončení kvašení se nazývá mladé víno [28, 30, 32]



Obr. 15: Nerezové tanky pro kvašení moštu

2.2.2.5 Dokvašování vína

Po skončení alkoholového kvašení a biologického odbourávání kyselin začíná další významná etapa vývoje vín - vytváření čili formování vína. Dobíhají intenzivní biochemické změny kvašení, zvyšuje se pH vína, protože končí redukční činnost kvasinek. Oxid uhličitý, který se již tvoří jen v malém množství, nestačí víno chránit před vniknutím vzduchu zvenčí. Je proto nutné víno dolévat až po zátku a po dolítí uzavřít.

Čím více se zachovají redukční vlastnosti vína, tím je jeho celkový charakter a sensorické vlastnosti kvalitnější. Další ošetření vína velmi závisí na požadavcích na konečný produkt. [29, 32]

2.2.2.6 Ošetřování a školení vína

Ošetřování a školení vína vytváří konečné sensorické vlastnosti a celkový charakter vína. Mladá vína ze severních oblastí, tedy i od nás, zvláště v nepříznivých letech, jsou po ukončení hlavního kvašení stále kyselá, i když se jejich kyselost zmírnila vysrážením solí kyseliny vinné. Podstatné snížení kyselosti se však dosáhne až po biologickém odbourání kyselin, především kyseliny jablečné. Po kvašení se víno ukládá do zasiřených ležáckých tanků nebo cisteren a ve starých závodech do dřevěných sudů [28, 30]

Víno zraje ležením v tancích (Obr. 16). Při stálé a nízké teplotě v ležáckém sklepe dochází k vytváření buketu a k harmonickému vyrovnání sensorických vlastností - vůně a chuť se zaokrouhlují. Doba zrání závisí na mnoha faktorech, jako je odrůda a ročník vína, teplota, přístup kyslíku, materiál a velikost tanků aj. Bílá vína zrají optimálně půl až dva roky. Zráním a ležením získá víno sudovou zralost. [28, 30, 33]



Obr. 16: Dřevěný sud na několikaleté zrání vína

Školení vína se provádí před plněním do lahví a zahrnuje čiření, stabilizaci, pasteraci a filtraci.

- Čiření - provádí se u vína, u kterého neproběhlo v dostatečné míře samovolně, a používá se srážecích prostředků (želatina, kasein aj.), kterými se ve víně srážejí přítomné nebo přidané třísloviny, dále hexakyano-železnatan draselný, který sráží těžké kovy za vzniku sraženiny berlínské modři, čímž se z vína strhávají i jemné koloidní látky (tzv. modré čiření).
- Stabilizace - používají se adsorpční prostředky (bentonit, polyamidy, agar), na něž koloidní složky vína adsorbují.
- Pasterace - probíhá krátkodobým ohřevem na 60 - 70 °C v deskových průtokových výměnících tepla a následným rychlým ochlazením.
- Filtrace - nejčastěji se používají deskové nebo naplavovací křemelinové filtry, obdobně jako v pivovarnictví. V moderních vinařských provozech se zavádí "cross-flow" filtrace a membránové filtrace. Místo filtrů lze použít též vysokoobrátkové kalové odstředivky. [28, 30]

Po skončeném školení, kdy víno je optimálně vyzrálé a je ukončen proces tvorby aroma a chuti vína, což většinou trvá nejdéle 1 rok, se provádí závěrečné úpravy hotového vína a poté se víno plní do lahví či jiných expedičních obalů. Mezi závěrečné úpravy řadíme scelování vína, úpravu koncentrace zbytkového cukru, ethanolu a kyselin, odkyselování či okyselování vína, barvení či odbarvování vína, alkoholizování vína a osvěžování vína. Scelováním vína se dosahuje sjednocení a standardizování kvality jednotlivých partií podle požadavků na senzoričké vlastnosti a obsah nejdůležitějších složek, zejména zbytkového cukru, koncentrace ethanolu a kyselin. Dodatečné odkyselování vína se provádí jejich vysrážením přídatkem uhličitanu vápenatého nebo speciálních směsí různých anorganických solí. Dodatečné okyselování vína lze provést přídatkem povolených potravinářských kyselin (vinné, citrónové, mléčné), sádrováním či fosfátováním vína. Barvení a odbarvování vína lze

u přírodních vín provádět pouze v rámci technologických zákroků. Alkoholizování vína je povoleno pouze u dezertních vín. Osvěžování vín se provádí sycením vína oxidem uhličitým. [28, 30]

2.2.2.7 Stáčení vína

Hlavním požadavkem při stáčení vína do obalů je, aby víno bylo dostatečně vyzrálé a vyškolené, aby nemělo sklon k tvorbě zákalů a nedocházelo u něho k dodatečným změnám sensorických vlastností. U nás se víno stáčí převážně do skleněných lahví. Některé druhy vín se stáčí do speciálně tvarovaných lahví a stolní vína se stáčí do papírových krabic i PET lahví. [30]

2.2.3 Nemoci vína

Nemoci vína způsobují především bakterie a kvasinky, které mohou z vína vyrobít nepoživatelný a nepoužitelný patok. Mezi nejčastější nemoci vína patří např. křís, octovatění a mléčné kvašení. [34]

2.2.3.1 Křís

Křís patří mezi nejrozšířenější onemocnění vína a postihuje mladší vína s nižším obsahem alkoholu. Onemocnění způsobují kožkotvorné kvasinky *Candida vini* a *Pichia membranifaciens*, které na povrchu vína v nedoplněných nádobách vytvářejí bílý škrálop. Při zanedbání této hrozby dochází k rozkladu kyselin, cukrů i buketu a ke vzniku škodlivých zplodin. Rozvoj těchto kvasinek se zastaví odstraněním křísu filtrací a zasněním vína. Zabránit vzniku křísu můžeme včasným doléváním vína do nádob a průběžnou kontrolou zdravotního stavu vína. [34, 35]

2.2.3.2 Octovatění neboli octové kvašení

Octovatění lze považovat za jedno z nejvážnějších onemocnění. Vzniká oxidací alkoholů, působením bakterií octového kvašení *Acetobacter* a nedá se z vína odstranit. Vyskytuje se hlavně u vín, při jejichž výrobě byly použity nahnílé, naplesnivělé nebo jinak poškozené hrozny. Octové bakterie se velmi rychle množí při teplotách nad 30°C, proto je nutné při kvašení hlídat teplotu. Pokud už k octovatění došlo, je potřeba vypařit a pečlivě vydesinfikovat i sud, ve kterém k nemoci došlo. [34, 35]

2.2.3.3 Mléčné a manitové kvašení

Mléčné kvašení se objevuje především u vín s nízkým obsahem kyselin a vysokým obsahem neprokvašeného zbytkového cukru a vyvolávají jej bakterie mléčného kvašení. Bakterie se nejlépe množí při teplotách nad 25°C. Nemocný mošt nebo víno má sladkokyselou chuť a páchne po kysaném zelí. Pokud již v moštu nebo ve víně proběhlo mléčné kvašení, je nutné oba roztoky zasněnit. Nepříjemné chuti je možné je zbavit např. přidáním čerstvého, zdravého moštu nebo čířením kvasnicemi. Hotové víno je vhodné pasterizovat a scelit s vínem s vysokým obsahem kyselin a opět zasněnit. [34]

2.2.4 Odrůda Sauvignon

Tato odrůda pochází z největší francouzské vinařské oblasti Bordeaux a je jednou z nejrozšířenějších odrůd. U nás se ve větším měřítku pěstuje až od padesátých let a to nejvíce na Moravě. [34]

Odrůdový charakter vína se liší podle původu. U nás je to kvalitní víno žlutozelené barvy s výraznou vůní i chutí s tóny po broskvích, černém rybízu, po kopřivách, podle půdních podmínek a ročníku. Sauvignon z jižních a zámořských zemí je extraktivním vínem s intenzivní vůní lišící se od vůně našich Sauvignonů. [35]

Sauvignon patří k raným odrůdám, které včas dozrávají a dosahují vysokou cukernatost. V příznivých vegetačních podmínkách ho napadá ušlechtilá plíseň *Botrytis cinerea*, která mu přidává specifickou charakteristickou chuť a buket. Sauvignon vyniká vysokým obsahem alkoholu a průměrným obsahem kyselin. Obsah kyselin se snižuje v okamžiku, kdy odrůdu napadne ušlechtilá plíseň *Botrytis cinerea*. Vysokou kvalitu s jemnými tóny vanilky a tříslovin získávají tato vína prokvašením v dubových sudech. Ve střední Francii je to jedna z hlavních bílých moštových odrůd. [8, 35]

2.2.5 Ekologická produkce vína

Ekologické zemědělství

Ekologické zemědělství je moderní formou obhospodařování půdy bez používání chemických vstupů s nepříznivými dopady na životní prostředí. Tento zemědělský produkční systém, který umožňuje produkovat vysoce kvalitní potraviny, je nedílnou součástí agrární politiky ČR.

Kromě produkce biopotravin přispívá ekologické zemědělství k lepším životním podmínkám chovaných zvířat, k ochraně životního prostředí a ke zvýšení biodiverzity prostředí.

Garantem dodržování pravidel pro ekologické zemědělství, a to jak národní, tak evropské legislativy, je Ministerstvo zemědělství, které dále administruje státní podporu pro ekologické zemědělce v rámci národních dotací a Programu rozvoje venkova. [36]

Ekologicky produkované víno („biovíno“)

„Biovíno“ je víno vyráběné z hroznů získávaných z vinné révy pěstované podle pravidel ekologického zemědělství podle Nařízení rady EHS/2092/91 o ekologickém zemědělství a Zákona 242/2000 Sb. o ekologickém zemědělství. Zpracování hroznů na víno probíhá bez používání šlechtěných kvasinek, enzymů a dalších syntetických čířících a stabilizačních látek. Výsledkem je přírodní víno bez syntetických reziduí, jehož výroba proběhla od začátku do konce s maximálním ohledem na životní prostředí. [37]

Ochrana před škůdci, chorobami a plevely se zajišťuje kombinací níže uvedených opatření: - výběrem vhodných druhů a odrůd

- vhodným osevním postupem
- mechanickými kultivačními postupy
- ochranou přirozených nepřátel (predátorů) škůdců pomocí opatření, která jsou pro ně příznivá (např. hnízdiště, vypouštění dravců, apod.)
- termickou regulací plevelů

V případě bezprostředního ohrožení plodin je možné uchýlit se k přípravkům nebo prostředkům, které jsou uvedeny v tabulce (Tab.1.). [38]

Tab. 1: Příklady některých přípravků nebo prostředků používaných v ekologickém zemědělství

Název	Typ prostředku	Popis, požadavky na složení, podmínky použití
chlévká mrva	hnojivo	produkt skládající se ze směsi živočišných výkalů a rostlinné hmoty (stelivo)
rašelina	hnojivo	použití omezeno na zahradnictví (zelinářství, pěstování květin a školkařské výpěstky)
kompostovaná nebo fermentovaná směs rostlinných materiálů	hnojivo	výrobek získaný ze směsi rostlinných materiálů, které byly podrobeny kompostování nebo anaerobní fermentaci spojené s výrobou bioplynu
popel ze dřeva	hnojivo	ze dřeva, které nebylo chemicky ošetřeno
síran draselný	hnojivo	výrobek získaný ze surové draselné soli fyzikální extrakcí, jenž může obsahovat také soli hořčíku
želatina	přípravek na ochranu rostlin	insekticid
lecitin	přípravek na ochranu rostlin	fungicid
výtažek (vodný roztok) z <i>Nicotiana tabacum</i>	přípravek na ochranu rostlin	insekticid, pouze proti roztočům na subtropických ovocných stromech nebo tropických rostlinách, lze použít pouze na začátku vegetačního období
rostlinné oleje (např. máťový, borovicový, kmínový)	přípravek na ochranu rostlin	insekticid, akaricid, fungicid a prostředek proti klíčení
mikroorganismy (bakterie, viry a houby) např. <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Granulosis virus</i>	mikroorganismy	pouze geneticky neupravené výrobky ve smyslu směrnice 90/220/EHS ¹
feromony	přípravky v pastích	návnada, narušuje pohlavní chování
metaldehyd	přípravky v pastích	prostředek proti měkkýšům, pouze v pastích obsahujících repelent proti vyšším živočišným druhům
fosforečnan železitý	přípravky k povrchové aplikaci	přípravek určených k hubení měkkýšů

Tab. 1 pokračování

Název	Typ prostředku	Popis, požadavky na složení, podmínky použití
draselné mýdlo	další látky používané v ekologickém zemědělství	insekticid
Bordeauxová jícha (polysulfid vápenatý)	další látky používané v ekologickém zemědělství	fungicid, insekticid, akaricid
parafínový olej	další látky používané v ekologickém zemědělství	insekticid, akaricid
minerální oleje	další látky používané v ekologickém zemědělství	insekticid, fungicid

2.3 Metody pro izolaci kvasinek

Izolací rozumíme získávání čisté kultury určitého mikroorganismu ze směsi mikroorganismů. Při získávání čistých kultur z přírodního zdroje nebo při přečištění kontaminovaných kultur je nutno během kultivace zvýhodnit žádaný mikroorganismus a ostatní mikroorganismy co nejvíce potlačit nebo usmrtit. [39]

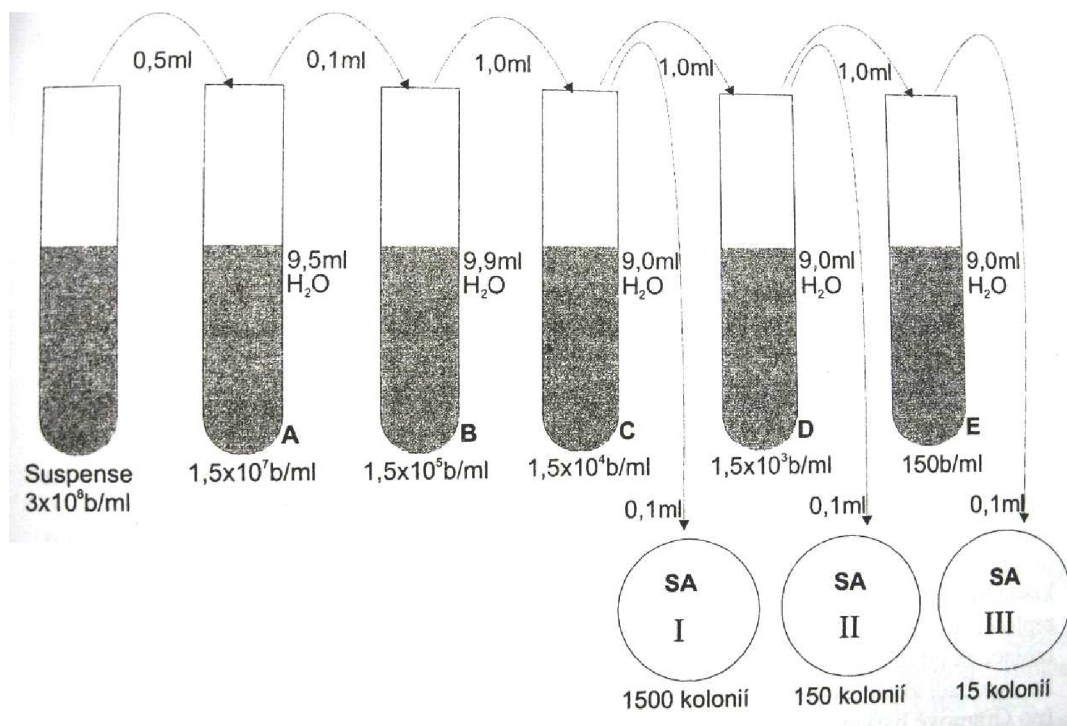
Princip izolace spočívá v dostatečném zředění mikrobiální směsi ve vhodné půdě takovým způsobem, aby kolonie, které vzniknou rozmnožováním, vyrostly z jedné buňky. Při metodách makroskopicky kontrolovatelných sledujeme vyvíjející se kolonie na Petriho miskách pouhým okem. Metody mikroskopicky kontrolovatelné dovolují sledování celého izolačního postupu pomocí mikroskopu a skýtají záruku, že narostlá kolonie vznikla skutečně z jedné buňky. Popsány zde budou pouze makroskopicky kontrolovatelné metody. [40]

2.3.1 Izolace litím desek

Tato metoda spočívá v rozmíchávání mikrobiální směsi do roztavené živné půdy a v postupném zředování do dalších půd, z nichž se desky lijí. Používá se většinou pro kvasinky (použitá půda je sladinová želatina) a pro bakterie (Luria-Bertaniho medium s agarem). Obsahuje-li směsná kultura vedle kvasinek ještě bakterie, hustá suspenze kvasinek se přenesení do Raulinova roztoku a nechá se stát 24 hod při laboratorní teplotě, čímž dojde k usmrcení většiny bakterií. [40]

2.3.2 Kochova metoda zředování v tekutém médiu a izolace roztěrem

Metoda je modifikací předchozí metody. Spočívá ve zředování suspenze buněk ve sterilní vodě nebo fyziologickém roztoku ve zkumavkách (Obr. 17). Z každé zkumavky se pak sterilní pipetou odebere 0,1 ml zředěné suspenze a rozetře skleněnou očkovací hokejkou na povrch tuhé živné půdy. Tato metoda se s výhodou používá hlavně pro kvasinky a plísň. (Obr.17) [39, 40]



Obr. 17: Příklad zředování při izolaci kvasinek roztěrem [39]

2.3.3 Izolace čárkováním na desky

Izolace touto metodou záleží na postupném čárkování a tím zředování mikrobiální směsi pomocí očkovací kličky na agarózovou desku. Je to nejuniverzálnější metoda použitelná pro bakterie, plísně, kvasinky i pro směsi těchto skupin, pokud se použije vhodná půda. Určitou skupinu mikroorganismů lze potlačit přidáním antibiotika nebo upravením pH. Tím se vytvoří předpoklad k růstu samostatných, dobře izolovaných kolonií. Aby k tomu však došlo, je k čárkování potřeba použít velmi malé množství dobře rozmíchané suspenze buněk. (Obr. 18) [39, 40]



Obr. 18: Různé způsoby izolace čárkováním na desky [39]

2.4 Izolace DNA kvasinek

Izolace biomakromolekul (proteiny, nukleové kyseliny) z přirozených materiálů je záležitost velice různorodá, vzhledem k různému původu a odlišnému charakteru jednotlivých makromolekul. Aby mohla být látka charakterizována, musí být v relativně čistém stavu a bez

příměsí, které by mohly charakterizaci rušit či zkreslovat. Existuje mnoho různých metod purifikace nukleových kyselin, ale jejich základní rysy jsou společné. Prvním předpokladem je dostupnost vstupního materiálu, kterým mohou být např. kultury bakteriálních nebo eukaryotických buněk, které je potřeba oddělit od růstového média. K uvolnění obsahu buněk je nutné vyvolat lyzi buněčné stěny. Výběr způsobu indukce lyze závisí na typu buňky. [4, 41]

2.4.1 Izolace DNA fenolovou extrakcí

Fenolová extrakce je klasická metoda pro odstranění proteinů z buněčných lyzátů. Extrakce je prováděna puřem ekvilibrovaným fenolem nebo směsí fenolu a chloroformu. Tyto organické látky se nemísí s vodou, a proto po přidání do vodného prostředí buněčného lyzátu tvoří dvě vrstvy. Když se směs důkladně promíchá, fenol oddělí od nukleových kyselin proteiny a chloroform je denaturuje a dojde k jejich vysrážení. Sraženinu proteinů lze centrifugací koncentrovat do fázového rozhraní, které odděluje těžší organickou fázi od lehčí vodné fáze. Organická fáze je tvořena pouze fenolem nebo směsí fenolu a chloroformu a ve vodné fázi se nachází nukleové kyseliny. Pokud se používá fenol ekvilibrovaný neutrálním nebo alkalickým puřem, nukleové kyseliny zůstanou ve vodné fázi. Pokud se k extrakci použije kyselý fenol, DNA přechází do organické fáze a ve vodné fázi zůstává pouze RNA. Toho se využívá při izolaci RNA. [4, 42, 43, 44]

2.5 Metody pro identifikaci kvasinek

Pro identifikaci kvasinek v půdě, listech, bobulích a moštu vinné révy byly použity metody polymerázová řetězová reakce (PCR), restrikční analýza a následná elektroforetická detekce PCR produktů a restrikčních fragmentů.

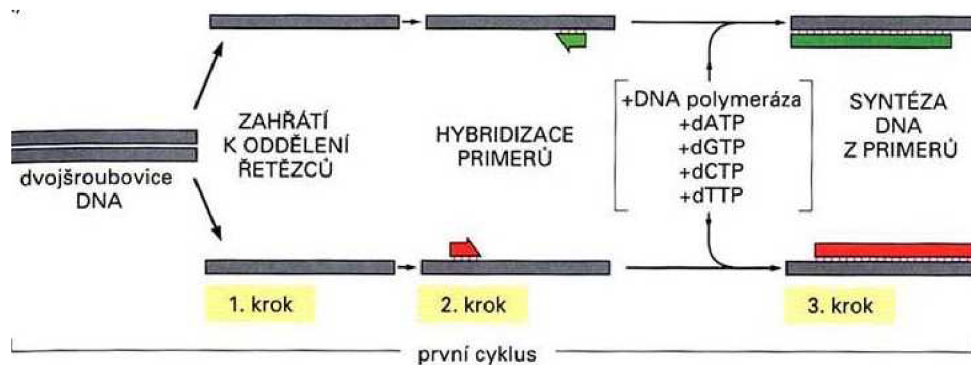
2.5.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce je enzymová metoda, která slouží k syntéze definovaného úseku DNA *in vitro*, pro nějž jsou k dispozici oligonukleotidové primery komplementární k 3' a 5' -koncevým sekvencím úseku, který má být amplifikován. Tato metoda poskytuje až 10^6 násobné pomnožení během 2-3 hodin. PCR probíhá v několika krocích, které zahrnují:

- denuraci templátu
- připojení primerů
- extensi připojených primerů DNA polymerázou (Obr. 19)

Opakování těchto kroků vede k syntéze segmentu s konci definovanými primery, které jsou inkorporovány do nově vznikajících molekul. Fragmenty této délky tvoří hlavní produkt reakce. Při prvním reakčním cyklu vznikají fragmenty jiné délky, než odpovídá vzdálenosti vymezené zvolenými primery. Ve druhém cyklu poskytují tyto nově vzniklé molekuly fragmenty DNA požadované délky, jejichž podíl exponenciálně roste v následujících cyklech reakce. Doba zdvojení odpovídá jednomu cyklu denurace templátu, připojení a extenze primeru. [40, 45, 46]

Vzhledem k vysoké citlivosti detekce je možné PCR použít pro zjištění přítomnosti velmi malého množství nukleové kyseliny ve vzorku. Základem úspěšné reakce je použití neporušeného úseku DNA, který má být amplifikován, a také navržení vhodných oligonukleotidových primerů, aby byla zajištěna specifita reakce. [45, 47]



Obr. 19: Kroky syntézy DNA v jednom cyklu PCR [48]

2.5.1.1 Průběh PCR

Denaturace templátu

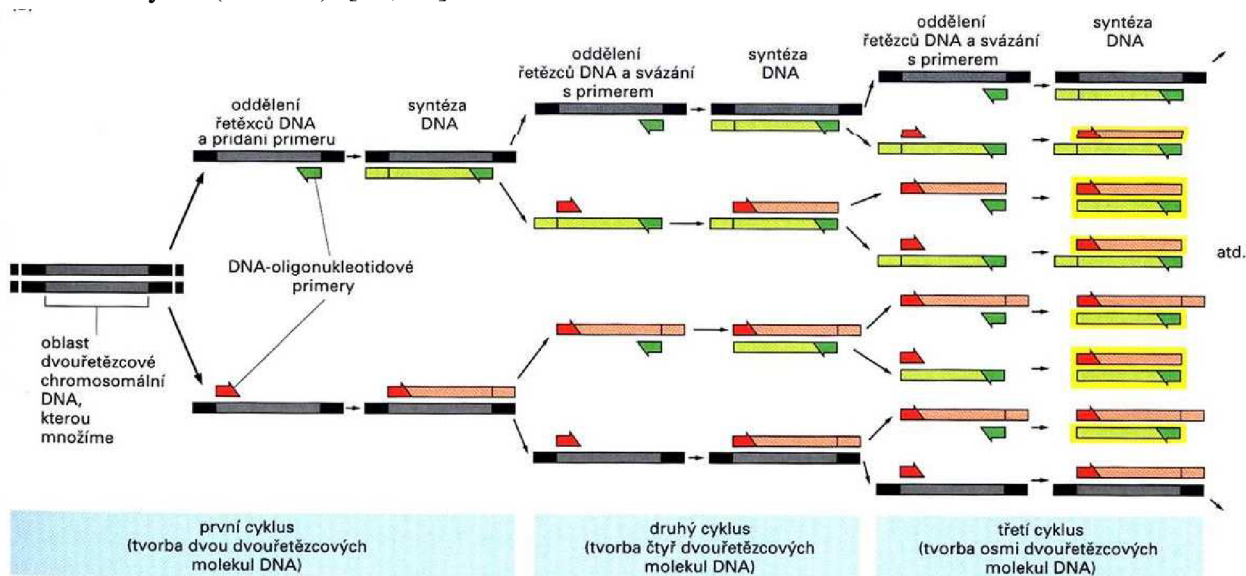
Tohoto efektu je dosaženo zvýšením teploty vzorku na 95°C. DNA je denaturována zpravidla 1-5 min. Je důležité, aby došlo ke kompletní denaturaci obou vláken, jinak by totiž mohlo dojít k velmi rychlé renaturaci celé molekuly, což by zabránilo interakci s primery. [45, 46]

Připojení primerů (annealing)

Druhým stupněm je renaturace, při níž je reakční směs ochlazená na zvolenou teplotu, která se pohybuje kolem 55°C. Teplota vhodná pro tuto reakci závisí na délce oligonukleotidu a na zastoupení A-T a G-C párů (tři vodíkové můstky, které fixují G-C, zvyšují stabilitu a tím i denaturační teplotu. [45, 46]

Syntetická fáze

V této fázi jsou tedy připojovány jednotlivé deoxynukleotidy ve směru 5' → 3'. Teplota je v případě použití *Taq* polymerázy při tomto kroku zvýšena na 75°C, což je teplotní optimum tohoto enzymu (Obr. 20). [45, 46]



Obr. 20: Syntéza DNA metodou PCR [48]

2.5.2 Restrikční analýzy

Restrikční analýzy jsou soubory technik, které využívají restrikční endonukleázy (restriktázy). Tyto bakteriální enzymy se vážou na specifické rozpoznávací sekvence dsDNA, dlouhé zpravidla 4-6 bp. Oba řetězce se štěpí uvnitř nebo poblíž této sekvence. Rozpoznávací sekvence mohou být unikátní (např. u enzymu *EcoRI*), nebo neurčité (např. *HindII*), kdy jeden nebo více nukleotidů v sekvenci je libovolných. Místo štěpení DNA se označuje jako restrikční místo. [49]

Počet restrikčních míst na zkoumané DNA je závislý na její velikosti, na její sekvenci a také na délce rozpoznávací sekvence. Činností restriktáz je DNA rozštěpena na několik fragmentů o různé délce, které lze od sebe oddělit elektroforézou. [49]

2.5.2.1 RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů)

Restrikční analýza DNA je metodou charakterizace DNA pomocí jejího štěpení restrikčními endonukleázami na fragmenty. Identifikace a analýza produktů štěpení se provádí elektroforetickým dělením. Je známo velké množství bakteriálních restrikčních endonukleáz (asi 1500), které se liší od sebe tím, že rozpoznávají různé krátké sekvence nukleotidů - 4, 6, 8 a že štěpí DNA na různě dlouhé fragmenty podle individuálního pořadí bazí a podle rozpoznané sekvence. Za daných podmínek vzniká reprodukovatelný počet restrikčních fragmentů o určité opět reprodukovatelné délce (= počtu bazí). Počet i délka fragmentů je pro daného jedince specifická. Odlišení různých DNA se provádí na základě polymorfismu délky štěpných úseků. Tento polymorfismus vzniká na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti rozpoznávacích a štěpných míst. Obecně restrikční endonukleázy, které rozpoznávají kratší sekvenci, štěpí DNA častěji na menší úseky, zatímco restrikční endonukleázy rozpoznávající delší sekvenci štěpí méně často a na delší fragmenty. [49, 50, 51]

2.5.2.2 PCR-RFLP

PCR-RFLP je modifikace standardní PCR používaná pro typizaci cílové sekvence, obvykle určitého genu, obsahujícího sekvenční polymorfismus. V závislosti na volbě primerů může být provedena analýza jakékoliv DNA. Sekvence DNA o délce až 5 kb se amplifikuje za přísných podmínek pomocí primerů připojujících se ke koncovým konzervativním oblastem. Výsledkem amplifikace jsou produkty PCR stejné délky, které se detekují elektroforeticky. Amplifikované produkty jsou štěpeny restrikční endonukleázou a poté opět analyzovány elektroforézou v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. [4, 50]

2.5.2.3 Restrikční endonukleázy

Restrikční endonukleázy jsou sekvenčně specifické endonukleázy, které produkují kmeny většiny bakterií. Restrikční enzymy jsou zařazeny do tří tříd, z nichž nejvýznamnější jsou restrikční endonukleázy II. třídy. Tyto enzymy rozpoznávají krátké specifické nukleotidové sekvence 4 bp, 6 bp, 8 bp a štěpí dsDNA uvnitř těchto sekvencí nebo vedle nich. K rozštěpení dochází hydrolýzou fosfodiesterových vazeb obou řetězců v restrikčním místě. Produktem štěpení jsou úseky DNA o definované délce - restrikční fragmenty.

Názvy restrikčních endonukleáz jsou odvozeny z počátečního písmene rodového a prvních dvou písmen druhového jména mikroorganismu, z něhož byly izolovány. Kmen organismu je označen písmenem nebo číslicí. Pokud určitý kmen produkuje více enzymům

odlišují se navzájem římskými číslicemi (např. *Hae*III - *Haemophilus aegypticus*, enzym III, *Bam*HI - *Bacillus amyloliquefaciens*, kmen H, enzym I) [4]

Tab. 2: Příklady některých restričních endonukleáz [4]

Restriční endonukleáza	Producent enzymu	Rozpoznávací místo na sekvenci DNA
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegypticus</i>	5'...GG [▼] CC...3' 3'...CC [▲] GG...5'
<i>Hin</i> fI	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'...G [▼] ANTC...3' 3'...CTNA [▲] G...5'
<i>Taq</i> I	<i>Thermus aquaticus</i>	5'...T [▼] CGA...3' 3'...AGC [▲] T...5'
<i>Alu</i> I	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'...AG [▼] CT...3' 3'...TC [▲] GA...5'
<i>Mse</i> I	<i>Micrococcus species</i>	5'...T [▼] TAA...3' 3'...AAT [▲] T...5'
<i>Hha</i> I	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	5'...C [▼] CGG...3' 3'...GGC [▲] C...5'
<i>Hpa</i> II	<i>Haemophilus aphrophilus</i>	5'...GCG [▼] C...3' 3'...C [▲] GCG...5'

2.5.3 Elektroforéza

Elektroforéza je fyzikálně-chemická metoda pro dělení látek v elektrickém poli a je nejdůležitější technikou při separaci nukleových kyselin. Zařízení se skládá z elektroforetické vany s anodou, katodou a pufrem, vlastního držáku gelu, ve kterém probíhá separace a externího zdroje stejnosměrného napětí (Obr. 21). Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny, proto DNA migruje směrem k anodě. Rychlost migrace DNA závisí na jejich vlastnostech (molární hmotnost - velikost, elektrický náboj, prostorové uspořádání), na vlastnostech gelu, prostředí (pufri) a na velikosti napětí. [4, 49]



Obr. 21: Zařízení pro elektroforézu

2.5.3.1 Princip elektroforézy

Elektroforéza spočívá v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Elektrické pole se vytváří vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. Vzorek se dávkuje do daného místa v systému. Kationy migrují k zápornému pólu, aniony ke kladnému a neutrální částice (molekuly) se nepohybují vůbec.

Každá částice má svoji elektroforetickou pohyblivost μ_e . Elektroforetická pohyblivost je rychlost pohybu nabité částice v elektrickém poli o jednotkové intenzitě.

Na nabitou částici o náboji Q působí dvě síly: síla F_1 (elektrická), která jí uvádí do pohybu a F_2 (odpor viskózního prostředí), která ji brzdí.

$$F_2 \leftarrow \text{O} \rightarrow F_1 \qquad F_1 = Q \cdot E \\ F_2 = k \cdot v$$

$$\text{Při ustáleném toku: } F_1 = F_2 \Rightarrow Q \cdot E = k \cdot v \Rightarrow v = \frac{Q}{k} \cdot E \Rightarrow v = \mu_e \cdot E$$

Elektroforetická pohyblivost závisí na velikosti částic, náboje, viskozitě prostředí a iontové síle roztoku. U slabých elektrolytů se vyjadřuje efektivní elektroforetická pohyblivost μ'_e daná součinem $\alpha \cdot \mu_e$, kde α je stupeň disociace. [55, 53]

2.5.3.2 Elektroforéza v agarózovém gelu (AGE)

Elektroforéza v agarózovém či polyakrylamidovém gelu se používá k identifikaci, separaci a purifikaci fragmentů DNA. Fragmenty DNA jsou děleny v elektrickém poli v závislosti na jejich velikosti. Touto metodou může být detekován až 1 ng DNA. Volbou typu a koncentrace gelu lze zajistit vhodné podmínky pro dělení fragmentů v různých rozmezích molekulových hmotností (Tab.) Agarózový gel se připravuje rozvařením práškové agarózy v elektroforetickém pufru, který se nechá ztuhnout při pokojové teplotě. [40, 49]

Tab. 3: Rozmezí molekulových hmotností DNA separovaných v agarózovém gelu o různých koncentracích agarózy [40]

Koncentrace agarózy (%w/v)	Rozmezí molekulových hmotností DNA (kb)
0,3	5 - 60
0,6	1 - 20
0,7	0,8 - 10
0,9	0,5 - 7
1,2	0,4 - 6
1,5	0,2 - 3
2,0	0,1 - 2

Gel je barven ethidium bromidem, který je často přítomen již během elektroforézy. Ethidium bromid je interkalační činidlo, které se váže mezi vlákna DNA a červeno-oranžově fluoreskuje po ozáření UV zářením o vlnové délce 260-360 nm. [40]

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Chemikálie, přístroje, suroviny

3.1.1 Chemikálie

- Agaróza (SERVA, Německo)
- Sladina (pivovar Brno)
- Kvasničný extrakt (HiMedia, Indie)
- Ethanol 96% a 99,8% Lach-Ner s.r.o., Ostrava)
- Hydroxid sodný (Lach-Ner s.r.o., Neratovice)
- Octan sodný (LACHEMA, Brno)
- Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner s.r.o., Neratovice)
- Uhličitan sodný (LACHEMA, Brno)
- Kyselina boritá (MACH-CHEMIKÁLIE s.r.o., Ostrava)
- Ethidium bromid (Serva Bitech, Německo)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová EDTA (Sigma-Aldrich, Německo)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan $C_4H_{11}NO_3$ (SERVA, Německo)
- Komerční sada UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (Elizabeth Pharmacon spol.s.r.o., ČR)
- dNTP mix (Invitek, Německo)
- Primery (ITS1, ITS4) (Invitek, Německo)
- *Taq* DNA polymeráza (Kapa Biosystems, Boston USA)
- 10x *Taq* DNA pufr pro PCR mix (Invitek, Německo)
- 10x *Taq* DNA pufr pro PCR mix (Kapa Biosystems, Boston USA)
- Délkové standardy 100 bp, 20 bp (Elizabeth Pharmacon s.r.o., ČR)
- Restrikční endonukleázy: *Hae* III, *Hinf* I, *Taq*^α1, *Alu* I, *Mse* I (BioLabs, New England; Fermentas, Litva)
- Loading k nanášení vzorků (Fermentas, Litva)
- Parafínový olej (Penta, Praha)
- Sterilní destilovaná voda

3.1.2 Přístroje a pomůcky

- Termostat IP 100-U LTE SCIENTIFIC (Velká Británie)
- Vortex-Genie 2, MoBio (Biotech s.r.o., ČR)
- Vortex LABNET VX 100 (Biotech s.r.o., ČR)
- PCR box- AURA MINI (Bioair instruments, Itálie)
- Termocyklér PTC-100™ (MJ Research, Inc, USA)
- Mikrovlnná trouba ETA 1195 (ČR)
- Sterilní box pro mikrobiologickou práci AURA mini (Bioair instruments, Itálie)
- Centrifuga eppendorf 5417 R (Eppendorf AG, Německo)
- Zdroj napětí - SAVANT PS 250 (Biotech s.r.o., ČR)
- Zdroj napětí - Major Sciece MP-500P (Biotech s.r.o., ČR)
- Třepačka (Heidolph, Německo)
- Exsikátor
- Turbidimetr Ultrospec 10 (Amersham Biosciences, Švédsko)
- Předvážky EK-600 H (A&D, Instruments LTD, Japonsko)
- Analytické váhy (A&D, Instruments LTD, Japonsko)
- Elektroforetické vany (Owl separation systeme, model - B2, (Biotech s.r.o., ČR)
- Mikropipety Biohit (Biotech s.r.o., ČR)

- Mikropipety Nichpetex (Nichrio, Japonsko)
- Spektrofotometr DU 7400 (Beckman, USA)
- Transluminátor (Ultra Lum. INC, USA)
- NanoPhotometer™ UV/Vis (Implen GmbH, Mnichov, Německo)
- Qubit™ Fluorometer (Invitrogen™)
- Lednice a mrazák k uchování vzorků DNA
- Minicentrifuga National LABNET C – 1200 (Biotech s.r.o., ČR)
- Software Scion Image (Biotech s.r.o., ČR)
- Software BioNumerics (Applied Maths)
- Software LUCIA Net (Laboratory Imaging)
- Parafilm (American Nacional Can™, USA)
- Mikrokumavky Eppendorf
- Laboratorní sklo
- Mikroskop
- Bakteriologické kličky
- Stojany na mikrokumavky
- Kahan
- Špičky
- Buničitá vata
- Plastové Petriho misky
- Nůžky



Obr. 22: Termocyklér

3.1.3 Suroviny a mikroorganismy

K analýze byly použity kvasinky izolované z bobulí a vinného moštu z odrůdy bílého vína Sauvignon z eko vinice, které byly odebrány při 25°C. Cukernatost vinného moštu z eko vína byla 19° ČNM. Dodavatelem vzorků bylo Vinařství Holánek, sídlící v obci Ivaň v mikulovské vinařské podoblasti.

K identifikaci námi vyizolovaných kvasinek z bobulí moštu byly použity restriční mapy typových kvasinek. Tyto kvasinky byly získány ze sbírky kvasinek CCY uložené na Chemickém ústavu SAV v Bratislavě a jejichž restriční analýza byla již provedena v rámci předchozích diplomových prací. V této práci byla doplněna databáze typových kvasinek o dalších osm druhů kvasinek:

Issatchenkia orientalis (*Candida krusei*), *Cystofilobasidium bisporidii* - typový, *Cystofilobasidium infirmaminatur* - typový, *Pichia fluxuum*, *Sporobolomyces rozdus*, *Issatchenkia occidantalís*, *Saccharomyces pastorianus* - typový, *Saccharomyces pastorianus*.

3.2 Příprava kultivačních médií

3.2.1 Příprava sladivého kultivačního média

Jako kultivační médium byl použit sladivý extrakt s agarem. Do Erlenmeyerovy baňky o objemu 500 ml bylo nalito 200 ml sladiny, která byla zředěna vodou na cukernatost 7 °ČNM a bylo upraveno pH na 6,8 pomocí uhličitanu sodného. K tomuto roztoku byl přidán agar a vzniklá směs byla promíchána varem a 20 minut sterilizována. Kultivační médium bylo následně nalito do Petriho misek. Ke kultivačnímu médiu byly přidány kyselina propionová 0,25 ml/l s antibiotikem 250 µg/l. Antibiotikum zabraňuje růstu bakterií, kdežto kyselina propionová zabraňuje růstu plísní. Obě dvě přísady byly přidány do chlazeného vysterilizovaného kultivačního média (cca 60 °C).

3.2.2 Příprava šikmých agarů

Kultivační médium na přípravu šikmých agarů bylo připraveno stejným způsobem jako sladivé. Médium bylo nalito do zkumavek, které byly uloženy do šikmé polohy.

3.3 Odběry z půdy, listů, bobulí a moštu vinné révy

Vzorky bílého vína, odrůdy Sauvignon byly odebrány z několika míst vinice.

Bobule bílého vína byly odebrány ze dvou míst vinice, a to hned z kraje a potom přibližně uprostřed. Bylo odříznuto asi 20 bobulí, které byly vloženy do 300 ml Erlenmeyerovy baňky. K bobulím bylo přilito 200 ml sladivého kultivačního média a směs se nechala kultivovat 10 dní při pokojové teplotě.

Listy bílého vína byly odebrány opět ze dvou míst vinice, a to z výšky asi 1 m nad zemí a z výšky asi 2 m nad zemí. Odříznuty byly asi 2 listy, které byly nastříhány a vloženy do zkumavky. K listům bylo přilito 10 ml sladivého kultivačního média a směs byla kultivována 10 dní při pokojové teplotě.

Půda byla odebrána pouze z jednoho místa vinice. 5 g z odebraného množství půdy bylo smícháno s 50 ml sterilní vody a umístěno na 1 hodinu na třepačku.

Ze získaných suspenzí se odebralo 300 µl na Petriho misky se sladivou půdou s antibiotikem a kyselinou propionovou. Suspenze byla rozetřena hokejkou a byla kultivována 3-5 dní v termostatu při teplotě 26°C.

Vinný mošt byl odebírán každý druhý den. Byl filtrován přes mikrobiální filtr, který byl potom položen na Petriho misku se sladivou půdou s antibiotikem a kyselinou propionovou. Petriho misky byly kultivovány 5-7 dní v termostatu při teplotě 26°C.

3.4 Izolace čisté kultury kvasinek

Izolace čistých kultur kvasinek byla prováděna postupným vyředováním. K vyředování byla použita zředovací metoda.

Ve sterilním boxu byly nachystány 3 zkumavky. Do dvou z nich bylo napipetováno 10 ml sterilní destilované vody a do třetí 9 ml sterilní destilované vody. Ze směsné kvasinkové kultury byly odebrány dvě kličky, které byly vloženy do první zkumavky s 10 ml vody. Směs byla promíchána a bylo odebráno 50 μ l do druhé zkumavky s 10 ml vody. Opět byla směs promíchána a tentokrát byl odebrán 1 ml do zkumavky s 9 ml vody. Směs byla promíchána. Z této směsi bylo odebráno 50 μ l na Petriho misku s kultivačním médiem a křížovým roztěrem rozetřena. Takto připravené Petriho misky byly uloženy do termostatu a kultivovány 3-5 dní při teplotě 26°C.

Po uplynutí této doby byly Petriho misky s narostlými koloniemi přeočkovány ve sterilním boxu na nové Petriho misky s kultivačním médiem. Po přeočkování byly všechny Petriho misky uloženy v termostatu při teplotě 26°C a kultivovány 2-3 dny.

Tento postup byl opakován až do získání čistých kvasinkových kultur. (Obr. 23)



Obr. 23: Čisté kultury kvasinek po několikerém přečištění

3.5 Izolace kvasinkové DNA

K izolaci kvasinkové DNA byla použita komerční sada UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit. (Obr. 24)

Z čistých kultur jednotlivých kvasinek byly odebrány 2 očka bakteriologické kličky, vloženy a rozsuspendovány v rozbíjecí mikrozkumavce (MicroBead Tube) s 300 μ l rozbíjecího pufru (MicroBead Solution). Do rozbíjecí mikrozkumavky bylo přidáno 50 μ l roztoku MD1 (Solution MD1). Mikrozkumavky byly vloženy v horizontální poloze do adaptéru k vortexu (Mo Bio Vortex AdapterTM) a vortexovány 10 min. Poté byly mikrozkumavky centrifugovány při 10 000 x g po dobu 30s při pokojové teplotě. Supernatant byl odebrán a přenesen do čisté mikrozkumavky a bylo přidáno 100 μ l roztoku MD2 (Solution MD2). Směs byla 5s vortexována, inkubována 5 min při 4°C a centrifugována při 10 000 x g po dobu 1 min při pokojové teplotě. Veškerý supernatant byl opět přenesen do čisté mikrozkumavky, bylo přidáno 900 μ l roztoku MD3 (Solution MD3) a vortexováno 5s. Ze vzniklé směsi bylo odebráno 700 μ l do mikrozkumavky s kolonkou a centrifugováno při 10 000 x g 1 min. Přefiltrovaný roztok byl odstraněn a na kolonku byl přenesen zbytek směsi. Opět bylo centrifugováno při 10 000 x g 1 min. Přefiltrovaný roztok byl odstraněn, na kolonku bylo přidáno 300 μ l roztoku MD4 (Solution MD4) a centrifugováno při 10 000 x g 1 min. Kolonka byla přenesena do čisté mikrozkumavky, do jejího středu bylo pipetováno 50 μ l roztoku MD5 (Solution MD5). Opět proběhla centrifugace při 10 000 x g 1 min. Kolonka byla odstraněna a vyizolovaná DNA byla uchována při -20°C.



Obr. 24: Sada UltraCleanTM Microbial DNA Isolation Kit pro izolaci DNA kvasinek

3.6 Příprava roztoků potřebných pro metodu PCR, restriční analýzu a elektroforetickou detekci fragmentů

3.6.1 Příprava Tris-borátového pufru (TBE)

Nejprve byl připraven zásobní roztok 10xTBE a z něj byly připraveny dva pracovní roztoky 1xTBE a 1xTBE s ethidium bromidem.

3.6.1.1 Příprava zásobního roztoku 10xTBE

Na zásobní roztok bylo naváženo 108 g Tris a 55 g kyseliny borité, které byly rozpuštěny v destilované vodě. Po rozpuštění obou chemikálií byl roztok přelit do odměrné baňky o

objemu 1 l. Ke směsi bylo přidáno 40 ml 0,5M roztoku EDTA o pH 8 a odměrná baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou.

Příprava 0,5M EDTA o pH 8

Na přípravu tohoto roztoku bylo naváženo 9,36 g EDTA. Navážené množství bylo přeneseno do odměrné baňky o objemu 50 ml a rozpuštěno v destilované vodě. pH bylo upraveno pomocí 0,5% roztoku NaOH a směs byla doplněna po rysku destilovanou vodou.

Příprava 0,5% NaOH

Na přípravu bylo naváženo 0,25 g NaOH. Navážené množství bylo rozpuštěno v kádince, přeneseno do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplněno po rysku destilovanou vodou.

3.6.1.2 Příprava pracovního roztoku 1xTBE bez ethidium bromidu

Ze zásobního roztoku 10xTBE bylo odlito 100 ml do odměrné baňky o objemu 1 l a množství bylo doplněno destilovanou vodou po rysku. Tento roztok byl dále použit na přípravu agarózových gelů.

3.6.1.3 Příprava pracovního roztoku 1xTBE s ethidium bromidem

Ze zásobního roztoku 10xTBE bylo odlito 100 ml do odměrné baňky o objemu 1 l a množství bylo doplněno destilovanou vodou po rysku. Ke vzniklému roztoku bylo navíc přidáno 100 µl ethidium bromidu. Tento roztok byl dále použit jako vyvíjecí roztok v gelové elektroforéze.

3.6.2 Příprava octanového pufru

Octanový pufr byl použit při přípravě vzorků pro restriční analýzu.

Na jeho přípravu bylo potřeba 2,46 g octanu sodného, který byl přenesen do odměrné baňky o objemu 10 ml. Bylo upraveno pH na 5,5 pomocí koncentrované HCl.

3.6.3 Příprava 2% agarózového gelu

2% agarózový gel byl použit jak při elektroforetické detekci PCR produktů, tak i při elektroforetické detekci restričních fragmentů po restriční analýze.

Na přípravu bylo potřeba 6 g agarózy, 300 ml 1xTBE bez ethidium bromidu a ethidium bromid. Směs agarózy a 1xTBE byla úplně rozvařena v mikrovlnné troubě na čirý roztok, který byl ponechán částečně vychladnout a potom k němu bylo přidáno určité množství ethidium bromidu - podle velikosti elektroforetické vany, do které byl gel nalíván. Nejčastěji byly používány objemy 30, 50 a 70 ml gelu a 3, 5 a 7 µl ethidium bromidu (0,01 %) Takto připravený gel byl nalit do vyvážené elektroforetické vany a byly vloženy hřebínky. Hřebínky po zatuhnutí a vytažení vytvořily jamky, do kterých potom byly nanášeny jednotlivé vzorky.

3.6.4 Příprava 80% ethanolu

Do 2 ml mikrozkušavky bylo odpipetováno 1,6 ml 96% ethanolu a 0,32 ml destilované vody. Mikrozkušavky byly uzavřeny, směs byla promíchána na vortexu a byly uchovány při teplotě -20°C.

K práci byl používán i 96% ethanol, který byl také uchováván v mikrozkuvkách při teplotě -20°C.

3.6.5 Příprava délkových standardů

3.6.5.1 Příprava délkového standardu 100bp

Tento délkový standard byl připraven od výrobce, proto již nebyl nijak upravován. Na gelovou elektroforézu bylo použito množství 1μl.

3.6.5.2 Příprava délkového standardu 20bp

Délkový standard 20 bp bylo nutné připravit. Na jeho přípravu bylo smícháno:

42,5 μl	sterilní destilované vody
10 μl	loading
7,5 μl	délkového standardu 20 bp.

Na gelovou elektroforézu bylo použito 6 μl tohoto standardu.

3.6.6 Příprava reakční směsi pro metodu PCR

Metoda PCR slouží ke zmnožení (amplifikaci) vyizolované kvasinkové DNA na takové množství, které bude lépe detekovatelné. Aby mohla reakce PCR proběhnout bylo potřeba připravit reakční směs, tzv. mastermix.

Reakční směs je složena ze 7 komponent, které je potřeba míchat v daném pořadí a její celkový objem pro jeden vzorek je 50 μl. Mastermix byl míchán v trojnásobném množství, aby bylo dostatek amplifikované DNA pro následnou restriční analýzu.

Reakční směs pro jeden vzorek obsahuje:

126,9 μl	sterilní destilované vody	}	146,4 μl
15 μl	pufu		
1,5 μl	dNTP mix		
1,5 μl	primer 1 (ITS1)		
1,5 μl	primer 2 (ITS4)		
3 μl	templátová DNA		
0,6 μl	<i>Taq</i> DNA polymerázy		
150 μl - v každé mikrozkuvce			

Reakční směs byla připravena po částech. Nejprve byla připravena směs sterilní destilované vody, pufu, dNTP mixu a obou primerů. Tato směs byla zvortexována a teprve potom byla přidána templátová DNA a *Taq* DNA polymeráza. V případě více vzorků byla první část směsi připravena najednou pro všechny vzorky, rozpipetována do jednotlivých mikrozkuvek (v požadovaném objemu) a potom byly přidány konkrétní templátové DNA a *Taq* DNA polymeráza.

3.6.7 Průběh reakce PCR

Reakce PCR probíhala ve třech krocích a 25 cyklech. (Tab. 4) Prvním krokem byla denaturace, která probíhala při 94°C. Druhým krokem byla vazba primerů tzv. annealing a

třetím krokem je elongace prodlužování řetězce. Po ukončení PCR se vzorky uchovávají při -20°C nebo se ihned detekují.

Tab. 4: Jednotlivé kroky v průběhu PCR a jejich parametry ve zvoleném programu K1

proces	teplota (°C)	čas (min)
denaturace	94	4
annealing (25 cyklů)	94	1
	48	0,5
	72	1
elongace	72	10

3.6.8 Elektroforetická detekce fragmentů PCR produktů

Vzorky po PCR byly detekovány pomocí gelové elektroforézy. Do připravené a vyvážené elektroforetické vany byl nalit rozvařený 2% agarozový gel s ethidium bromidem. Pro vytvoření jamek byly vloženy hřebínky. Po ztuhnutí a odstranění hřebíků byl do elektroforetické vany nalit pracovní roztok 1xTBE s ethidium bromidem. Vzorky byly pipetovány do řady v námi stanoveném pořadí a v množství 5 µl. Před jejich pipetováním do jamek byl každý vzorek smíchan s 1 µl nanášecího pufru - loadingu. Byla napipetována také negativní kontrola a to stejným způsobem a ve stejném množství jako vzorky. Na začátku i na konci této řady byl pipetován 1 µl délkového standardu 100 bp. Po napipetování všech vzorků byla vana připojena na zdroj elektrického napětí. Velikost napětí byla opět volena podle velikosti použité elektroforetické vany (45V, 55V a 65V) (Tab. 5).

Po proběhnutí elektroforézy byl gel vyjmut, vložen pod UV detektor, vyfocen a uložen pro další zpracování.

Tab. 5: Tabulka hodnot napětí, rozměru gelu a doby trvání elektroforézy v závislosti na velikosti použité elektroforetické vany

Elektroforetická vana	Volené napětí (V)	Rozměry gelu (cm)	Průměrná doba trvání elektroforézy (min)
malá	45	8 x 7	139
střední	55	11 x 9	146
velká	65	14 x 12	164

3.6.9 Příprava vzorků pro restrikční analýzu

Pro restrikční analýzu je nutné PCR produkty přečistit, protože by mohly obsahovat inhibitory, které by činnost restriktáz mohly omezit nebo jí úplně blokovat.

Po rozmražení PCR produktů bylo postupně z každého odpipetováno 20 µl do připravených čistých mikrozkuvek. Ke každému vzorku byly přidány 2 µl octanového pufru a potom 60 µl 96% ethanolu o teplotě -20°C. Směs byla promíchána na vortexu a centrifugována při 4°C, 15 000 x g po dobu 30 min. Poté byl supernatant dekantován a bylo přidáno 60 µl 80% ethanolu, opět o teplotě -20°C. Směs byla znovu vortexována a centrifugována při 4°C, 15 000 x g po dobu 30 min. Po centrifugaci byl supernatant slit a

mikrozkumavky byly vysušeny v exsikátoru, přibližně 20 min. Poté byly mikrozkumavky uzavřeny a uchovávány při -20°C.

3.6.10 Příprava reakční směsi pro restrikční analýzu

Reakční směs pro restrikční analýzu je složena ze 3 komponent, které je potřeba míchat v daném pořadí. Její objem pro jeden vzorek je 15 µl.

Reakční směs pro jeden vzorek obsahuje:

13 µl	sterilní destilované vody	} 15 µl
1,5 µl	pufro	
0,5 µl	enzymu	

Reakční směs byla připravena vždy najednou pro všechny vzorky. Následně byla směs rozpipetována do jednotlivých mikrozkumavek s přečištěnou a vysušenou DNA.

3.6.11 Restrikční analýza PCR produktů

Amplifikovaná DNA byla přečištěna a podrobena restrikční analýze. Restrikční analýza byla provedena pěti restrikčními endonukleázami: *HaeIII*, *HinfI*, *AluI*, *MseI* a *TaqI*. Restrikční analýza probíhala při teplotě 37°C, po dobu 16 h. Inaktivace enzymu probíhala při 2 teplotách podle použitého enzymu (Tab. 6). Proces probíhal v programovatelném termostatu. Získané fragmenty byly opět elektroforeticky rozděleny a detekovány pomocí UV záření.

Tab. 6: Enzymy a jejich inaktivační teplota

enzym	inaktivační teplota (°C)	volený program termostatu
<i>HaeIII</i>	80	R2
<i>HinfI</i>	80	R2
<i>TaqI</i>	80	R2
<i>AluI</i>	65	R1
<i>MseI</i>	65	R1

3.6.12 Elektroforetická detekce restrikčních fragmentů

Elektroforetická detekce byla provedena stejným způsobem a probíhala za stejných podmínek jak je popsáno v kapitole 3.6.8. Jediný rozdíl byl v tom, že bylo navíc použito 6 µl délkového standardu 20 bp, který byl pipetován na konci řady. Místo negativní kontroly byla použita kontrola pozitivní, kterou byl PCR produkt.

3.7 Alkoholová tolerance

Alkoholová tolerance byl sledována u vybraných druhů kvasinek. Byla sledována schopnost těchto kvasinek množit se v prostředích s různou koncentrací ethanolu.

Do 100 ml Erlenmeyerovy baňky bylo nalito 50 ml roztoku sladiny, která byla vysterilizována. Po sterilizaci byl přidán ethanol (99,8 %, p.a.) tak, aby jeho celková koncentrace v roztoku byla 1%, 4%, 8%, 12% a 16%. Do takto připravených směsí byl přidán

1 ml suspenze buněk kvasinek, která byla připravena rozsuspendováním jednoho očka bakteriologické kličky čisté kultury v 6 ml sterilní destilované vodě. Vzorky byly kultivovány při 26°C po dobu 10ti dní a každý den byla změřena koncentrace vzniklého zákalu.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V první části této diplomové práce byly izolovány kvasinky z bobulí a listů vinné révy, z půdy z vinice a z vinného moštu z odrůdy červeného vína Cabernet Moravia z eko vinice a bílého vína Sauvignon z integrované a ekologické vinice, které byly sterilně odebrány při teplotě 25°C. Vzorky pocházely z Vinařství Holánek, sídlící v obci Ivaň v mikulovské vinařské podoblasti. Odebrané bobule hroznů a listy, byly vloženy do sladidového kultivačního média a byly kultivovány 10 dnů při pokojové teplotě. Po 10-ti dnech bylo odebráno 300 µl suspenze kvasinek na Petriho misky a kultivováno 3-5 dní v termostatu při 26 °C. Vinný mošt byl odebírán každý druhý den kvasného procesu a celkově bylo takto provedeno 10 odběrů. Navíc bylo provedeno ještě 5 odběrů a to 16., 21., 31., 42. a 52. den kvasného procesu. Odebraný mošt byl filtrován přes bakteriologický filtr, který byl potom položen na Petriho misku a kultivován na sladidovém živném médiu v termostatu při teplotě 26 °C. Ze směsných kultur izolovaných vinných kvasinek byly postupně vyředovací metodou získány čisté kultury kvasinek. Za tímto účelem byly směsné kultury přečištěny 6-krát.

V rámci této diplomové práce byla izolována DNA pouze z kvasinek z vinného moštu a bobulí bílého vína Sauvignon, pěstovaného podle pravidel ekologického zemědělství. Vyizolovaná DNA byla naamplifikována metodou PCR, elektroforeticky detekována a vizualizovaná pomocí UV záření. Naamplifikované PCR produkty byly následně přečištěny a podrobeny restriční analýze. Restriční analýza byla provedena pomocí pěti restričních endonulkeáz - *HaeIII*, *HinfI*, *TaqI*, *AluI* a *MseI*. Naštěpené vzorky byly elektroforeticky detekovány a vizualizovány pomocí UV záření.

Dále byla izolována DNA z 12-ti druhů typových kvasinek, která byla zpracována stejným způsobem jako DNA izolovaná z moštu a bobulí vinné révy. K restriční analýze byly navíc použity ještě dvě restriční endonukleázy, a to *HhaI* a *HpaII*.

Byl také proveden test na alkoholovou toleranci, kterým bylo zjišťováno, při jaké koncentraci ethanolu jsou izolované kvasinky schopné rozmnožování.

4.1 Identifikace vinných kvasinek izolovaných z bobulí a moštu vinné révy

4.1.1 Amplifikace kvasinkové DNA metodou PCR

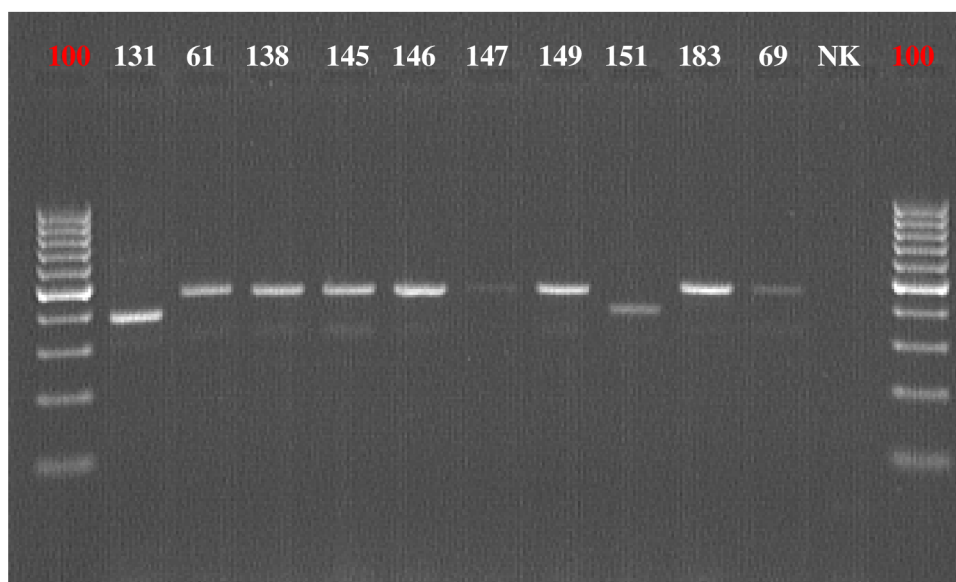
Vyizolovaná kvasinková DNA byla metodou PCR naamplifikována a vzniklé PCR produkty byly detekovány gelovou elektroforézou. Fragменты byly detekovány UV zářením a následně zpracovány. V tabulce 8 a 9 je uvedena velikost fragmentů DNA po reakci PCR.

Tab. 7: Pracovní čísla izolátů, vyizolovaných z bobulí, velikost jejich PCR fragmentů

Pracovní číslo izolátu	fragment PCR	Pracovní číslo izolátu	fragment PCR	Pracovní číslo izolátu	fragment PCR
1	880	104	450	69	450
128	750	138	450	70	450
160/2	750	145	450	90	450
97	620	146	450	160	450
156	620	147	450	190	450
161	620	149	450	151	390

Tab. 8: Pracovní čísla DNA kvasinek vyizolovaných z moštu, den odběru a velikost jejich PCR fragmentů

den odběru	Pracovní číslo izolátu	fragment PCR	den odběru	Pracovní číslo izolátu	fragment PCR
1.den	37	450	4.den	122	880
1.den	39	450	4.den	177	880
1.den	52	450	8.den	40	450
1.den	116	450	8.den	44	450
1.den	4	880	8.den	13	880
1.den	171	880	9.den	43	450
2.den	45	450	9.den	136	750
2.den	144	450	9.den	143	880
2.den	183	450	16.den	12	880
4.den	131	390	21.den	15	880
4.den	60	450	31.den	20	880
4.den	61	450	42.den	140	880
4.den	112	450	52.den	141	880



Obr. 25: Elektroforetické rozdělení fragmentů po amplifikaci metodou PCR

4.1.2 Restrikční analýza PCR produktů

Naamplifikované vzorky byly přečištěny a podrobeny restrikční analýze, která byla provedena pěti restrikčními endonukleázami: *HaeIII*, *HinfI*, *AluI*, *MseI* a *TaqI*.

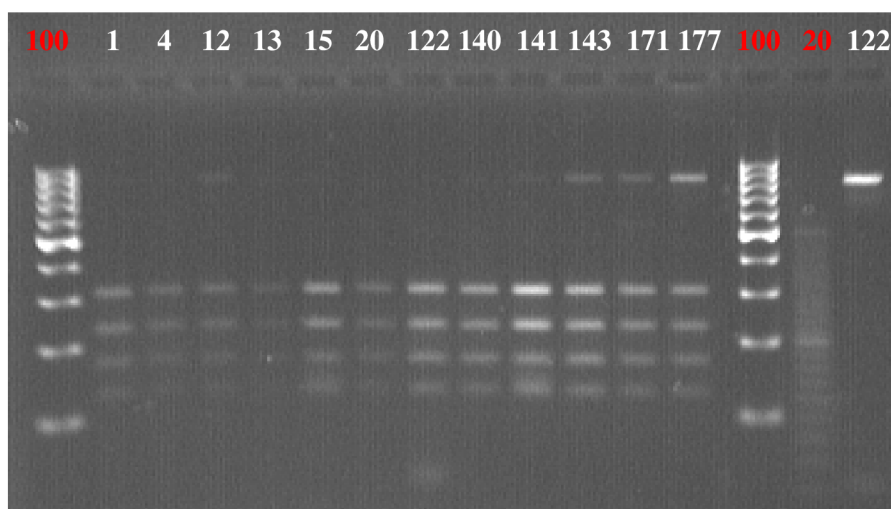
4.1.2.1 Amplikony s délkou fragmentů 880 bp

Izoláty s délkou PCR fragmentu 880 bp byly analyzovány pomocí pěti restrikčních endonukleáz, které je naštěpily na dva, čtyři a pět fragmentů. Velikosti všech těchto fragmentů po restrikční analýze jsou uvedeny v tabulce 9.

Podle stejných velikostí fragmentů lze usuzovat, že se jedná o jeden rod kvasinky.

Tab. 9: Velikosti štěpných fragmentů (v bp) získaných po restrikční analýze

Číslo izolátu	PCR	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>TaqI</i>	<i>AluI</i>	<i>MseI</i>
1	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
4	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
12	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
13	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
15	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
20	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
122	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
140	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
141	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
143	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
171	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
177	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100



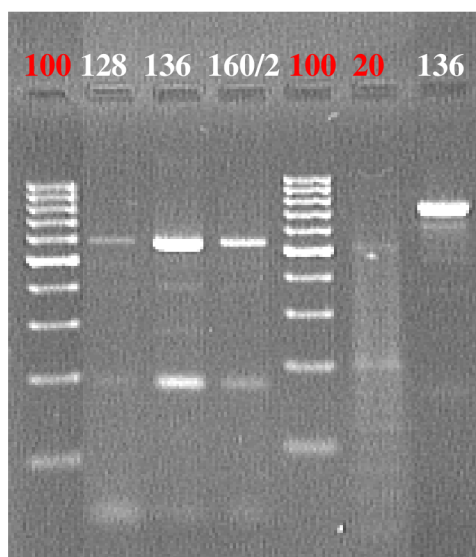
Obr. 26: Ukázka štěpení amplikonů s délkou 880 bp restrikční endonukleázou *HaeIII*

4.1.2.2 Amplikony s délkou fragmentů 750 bp

Amplikony s délkou fragmentu PCR produktu 750 bp byly taktéž analyzovány pěti restričními endonukleázami. Tyto izoláty byly naštěpeny pouze čtyřmi endonukleázami. Analyzovaný fragment 750 pb neobsahuje štěpnou sekvenci pro endonukleázu *HaeIII*, proto nebyl identifikován žádný štěpný produkt, jen původní fragment.

Tab. 10: Velikosti štěpných fragmentů (v bp) získaných po restriční analýze

Číslo izolátu	PCR	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>TaqI</i>	<i>AluI</i>	<i>MseI</i>
128	750	n	350+200+160	400+170+130	280+190	250+120+100+90
136	750	n	350+200+160	400+170+130	280+190	250+120+100+90
160/2	750	n	350+200+160	400+170+130	280+190	250+120+100+90



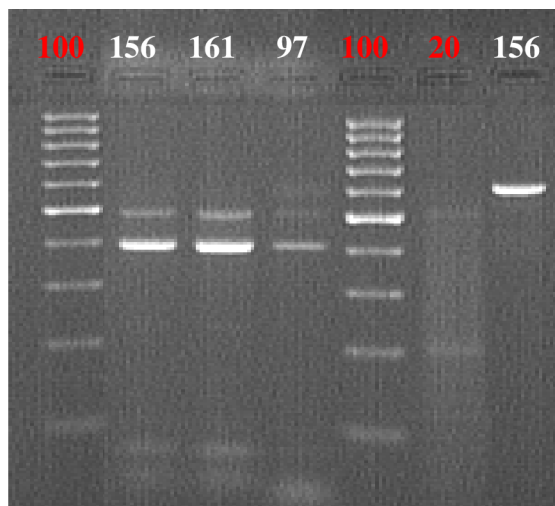
Obr. 27: Ukázka štěpení ampliconů s délkou fragmentů 750 bp restriční endonukleázou *AluI*

4.1.2.3 Amplikony s délkou fragmentů 620 bp

Kvasinkové DNA s délkou PCR fragmentu 620 bp byly také štěpeny pouze čtyřmi restričními endonukleázami. I zde neměla endonukleáza *HaeIII* svoji specifickou sekvenci nukleotidů pro štěpení. Ostatní endonukleázy naštěpily tyto izoláty na tři fragmenty, jejichž délky jsou uvedeny v tabulce 11.

Tab. 11: Velikosti štěpných fragmentů (v bp) získaných po restriční analýze

Číslo izolátu	PCR	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>TaqI</i>	<i>AluI</i>	<i>MseI</i>
156	620	n	280+130+110	340+220+65	390+110+90	400+90+60
161	620	n	280+130+110	340+220+65	390+110+90	400+90+60
97	620	n	280+130+110	340+220+65	390+110+90	400+90+60



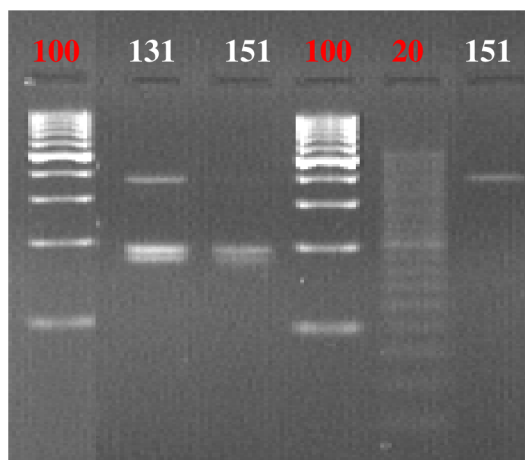
Obr. 28: Ukázka štěpení PCR fragmentů s délkou 620 bp restriční endonukleázou *MseI*

4.1.2.4 Amplikony s délkou fragmentů 390 bp

Při štěpení amplikonu s délkou PCR fragmentu 390 bp, došlo k naštěpení u endonukleáz *HaeIII*, *HinfI*, *TaqI* a *MseI*, a to vždy na dva fragmenty. Endonukleáza *AluI* tyto izoláty neštěpila.

Tab. 12: Velikosti štěpných fragmentů (v bp) získaných po restriční analýze

Číslo izolátu	PCR	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>TaqI</i>	<i>AluI</i>	<i>MseI</i>
131	390	280+90	190+180	290+150	n	290
151	390	280+90	190+180	290+150	n	290



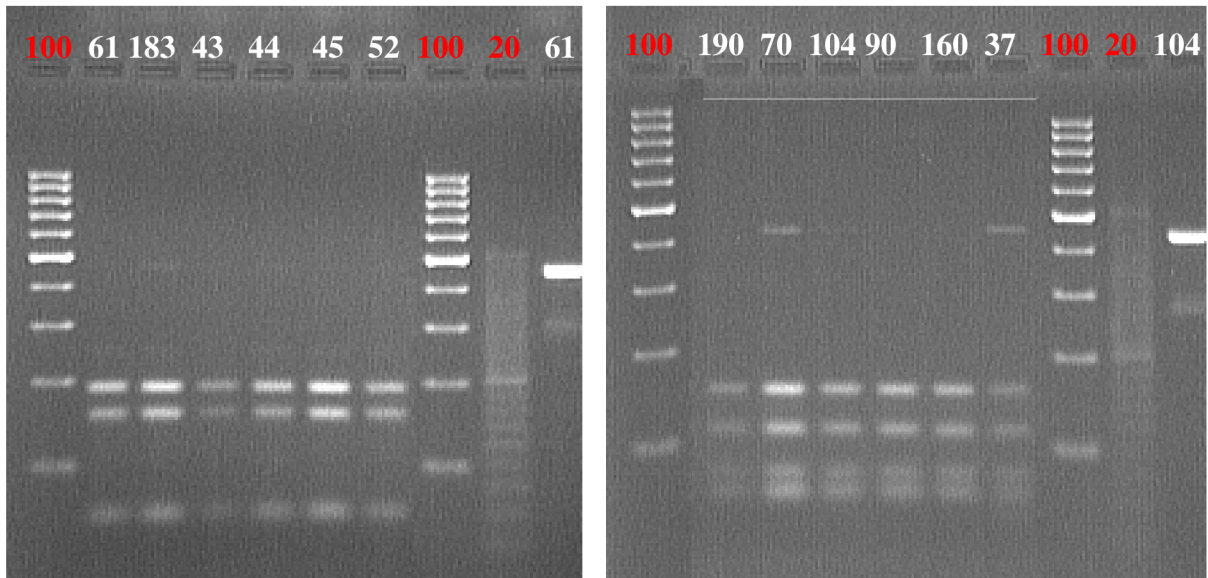
Obr. 29: Ukázka štěpení PCR produktů s délkou fragmentu 390 bp restriční endonukleázou *HinfI*

4.1.2.5 Amplikony s délkou fragmentů 450 bp

Amplikony s délkou PCR fragmentů 450 bp byly naštěpeny všemi endonukleázami. Endonukleázou *AluI* byly všechny izoláty naštěpeny na dva fragmenty o stejné velikosti, což naznačuje že se jedná o jeden rod kvasinky. Ostatní endonukleázy však štěpily tyto izoláty odlišně a z toho lze usoudit, že tato skupina obsahuje dva druhy kvasinky.

Tab. 13: Velikosti štěpných fragmentů (v bp) získaných po restriční analýze

Číslo izolátu	PCR	<i>HaeIII</i>	<i>HinI</i>	<i>TaqI</i>	<i>AluI</i>	<i>MseI</i>
183	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
39	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
40	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
61	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
43	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
44	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
45	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
52	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
60	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
112	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
116	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
144	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
69	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
190	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
160	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
37	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
138	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
145	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
146	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
147	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
149	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
70	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
104	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
90	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50



Obr. 30: Ukázka štěpení restriční endonukleázou *TaqI*. Na obrázku vlevo jsou vidět fragmenty po štěpení první skupiny PCR produktů. Na obrázku vpravo jsou fragmenty po štěpení druhé skupiny PCR produkt. Délka PCR fragmentů obou skupin je 450 bp.

4.2 Analýza typových kvasinek

Identifikace izolovaných kvasinek probíhá porovnáním s typovými kvasinkami. Byla provedena restriční analýza dalších 12ti typových kvasinek, čímž byla rozšířena stávající databáze typových kvasinek.

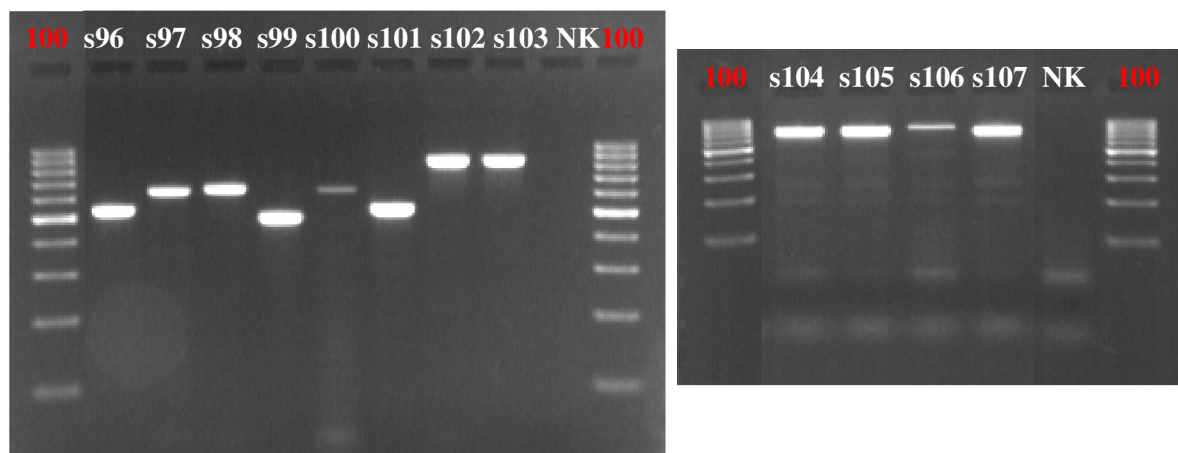
Mikroorganismy pocházely ze sbírky kultur kvasinek CCY z ChÚ SAV v Bratislavě. (Tab.14)

Tab. 14: Seznam typových kvasinek

Pracovní označení	CCY	Rod	Druh
s96	29-9-17	<i>Issatchenkia</i>	<i>orientalis</i>
s101	39-27-1	<i>Issatchenkia</i>	<i>occidentalis</i>
s97	62-7-1	<i>Cystofilobasidium</i>	<i>bisporidii</i>
s98	17-18-1	<i>Cystofilobasidium</i>	<i>infirmitum</i>
s99	41-11-2	<i>Pichia</i>	<i>fluxuum</i>
s100	19-6-15	<i>Sporobolomyces</i>	<i>roseus</i>
s102	21-6-7	<i>Saccharomyces</i>	<i>pastorianus</i>
s103	21-6-6	<i>Saccharomyces</i>	<i>pastorianus</i>
s104	48-80	<i>Saccharomyces</i>	<i>uvarum</i>
s105	48-79	<i>Saccharomyces</i>	<i>uvarum</i>
s106	21-53-2	<i>Saccharomyces</i>	<i>paradoxus</i>
s107	21-22-10	<i>Torulaspota</i>	<i>delbrueckii</i>

4.2.1 Izolace DNA typových kvasinek a její amplifikace metodou PCR

DNA byla izolována pomocí komerčního kitu UltraClean™ Microbial DNA Izolation Kit. Postup byl stejný, jako při izolaci DNA z vinných kvasinek. Vyizolovaná DNA byla podrobena PCR reakci a naamplifikované DNA byly elektroforeticky detekovány. (Obr. 31)



Obr. 31: Elektroforeogram PCR produktů typových kvasinek. NK - negativní kontrola, 100 - 100 bp standard, s96 - s107 - označení typových kvasinek

Tab. 15: Velikosti fragmentů PCR produktů typových kvasinek v bp

Pracovní označení	Fragment PCR	Pracovní označení	Fragment PCR
s99	500	s102	880
s96	550	s103	880
s101	550	s104	880
s97	650	s105	880
s98	660	s106	880
s100	650	s107	800

4.2.2 Restrikční analýza DNA typových kvasinek

Naamplifikované vzorky byly přečištěny a podrobeny restrikční analýze, která byla provedena sedmi restrikčními endonukleázami: *HaeIII*, *HinfI*, *TaqI*, *AluI*, *MseI*, *HhaI* a *HpaII*. Restrikční analýza endonukleázami *HhaI* a *HpaII* byla provedena pouze pro doplnění databáze typových kvasinek.

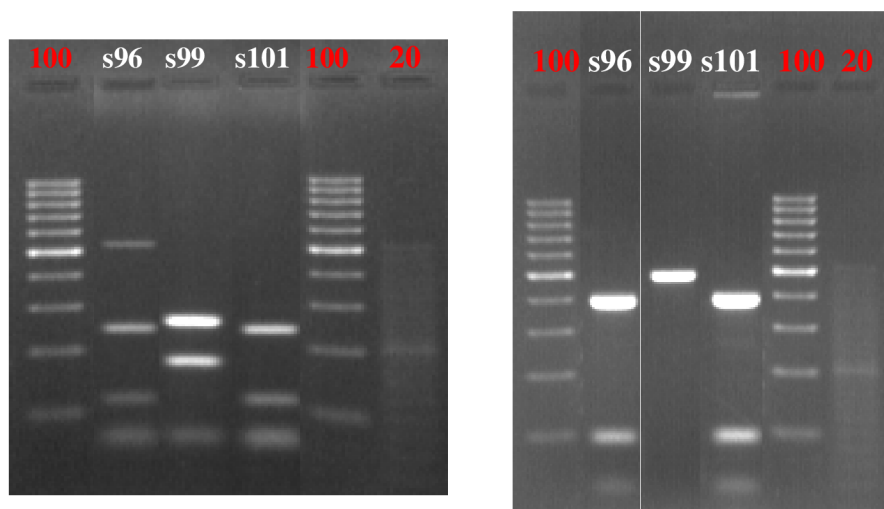
4.2.2.1 Amplikony s délkou fragmentů 550 a 500 bp

Délka fragmentů 550 bp patří typovým kvasinkám *Issatchenkia orientalis* (s96), *Issatchenkia occidentalis* (s101). Fragment 500 bp náleží druhu *Pichia fluxuum* (s99). Kvasinka druhu *Pichia fluxuum* (s99) byla naštěpena pouze třemi restrikčními

endonukleázami. Endonukleázami *Hae*III a *Alu*I tento druh kvasinky nebyl naštěpen. Kvasinky druhu *Issatchenkia orientalis* (s96) a *Issatchenkia occidentalis* (s101) byly naštěpeny všemi endonukleázami.

Tab. 16: Velikosti štěpných fragmentů (v bp) získaných po restriční analýze

Pracovní označení	PCR	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Mse</i> I
s96	550	400+100	240+170+150	250+120+70	380+140	500+20
s101	550	400+100	240+170+150	230+120+80	380+150	500+20
s99	500	n	240+240	270+190+80	n	220+120+90+60



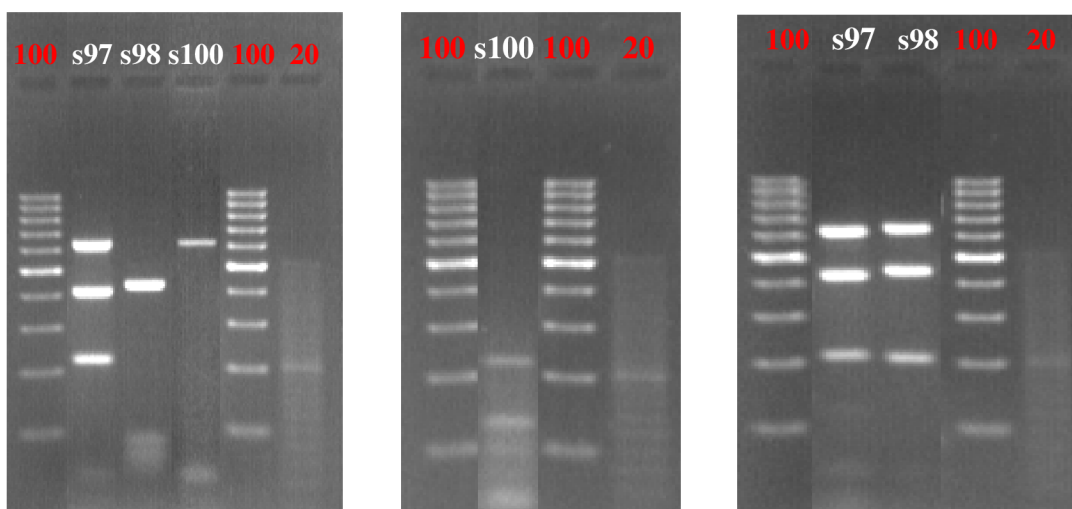
Obr. 32: Ukázka štěpení DNA typových kvasinek endonukleázami *Taq*I (vlevo) a *Hae*III (vpravo)

4.2.2.2 Amplikony s délkou fragmentů 650 a 660 bp

Délky fragmentů 650 a 660 bp patří typovým kvasinkám druhu *Cystofilobasidium bisporidii* (s97), *Cystofilobasidium infirmo-miniatum* (s98) a *Sporobolomyces roseus* (s100). Druhy *Cystofilobasidium bisporidii* (s97) a *Cystofilobasidium infirmo-miniatum* (s98) byly naštěpeny všemi restričními endonukleázami. Druh *Sporobolomyces roseus* (s100) nebyl naštěpen endonukleázou *Hae*III. Ostatní endonukleázy jej štěpily na dva až čtyři fragmenty (viz. Tab. 18).

Tab. 17: Velikosti štěpných fragmentů (v bp) získaných po restriční analýze

Pracovní označení	PCR	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Mse</i> I
s97	650	420+220	360+220+70	240+190+70	450+220+50	200+160+120
s98	660	450+90+70	290+210+190	230+200+90+70	480+220+50	270+100
s100	650	n	220+130+100+50		440+150	420+50



Obr. 33: Ukázka štěpení DNA typových kvasinek endonukleázami *HaeIII* (vlevo), *HinfI* (uprostřed) a *AluI* (vpravo)

4.2.2.3 Amplikony s délkou fragmentů 880 a 800 bp

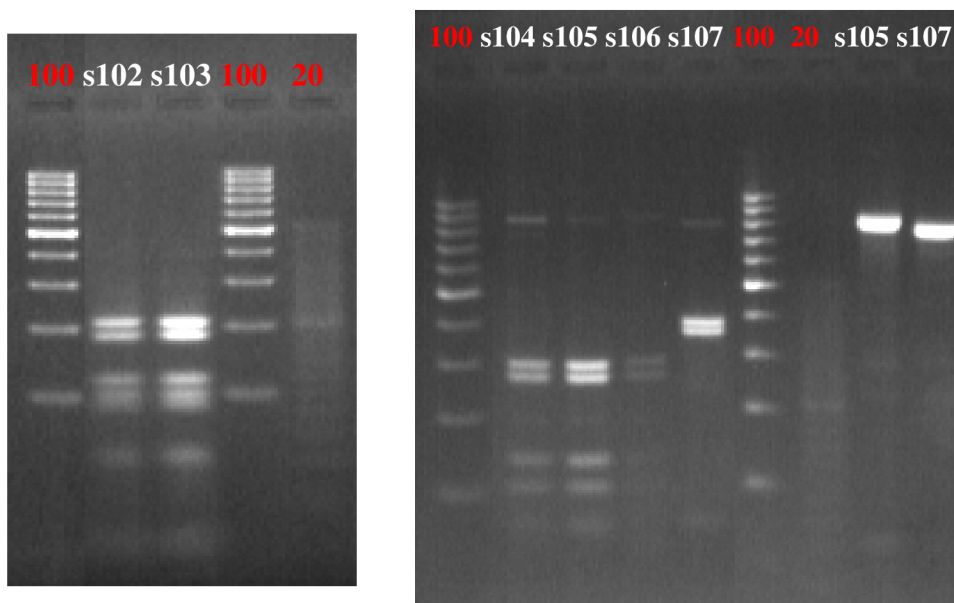
Amplikony s délkou fragmentů 880 bp patří typovým kvasinkám *Saccharomyces pastorianus* (s102, s103), *Saccharomyces uvarum* (s104, s105) a *Saccharomyces paradoxus* (s106). Druh *Torulaspora delbrueckii* (s107) má délku fragmentu 800 bp. Amplikony byly naštěpeny čtyřmi endonukleázami na dva až čtyři fragmenty. Endonukleázou *HaeIII* tento druh naštěpen nebyl. Druhy *S. pastorianus* (s102, s103), *S. uvarum* (s104, s105) a *S. paradoxus* (s106) byly naštěpeny všemi vybranými endonukleázami. Druhy *S. uvarum* (s104, s105) a *S. paradoxus* (s106) byly totožně štěpeny třemi endonukleázami, k rozdílnému štěpení došlo u endonukleáz *HaeIII* a *HinfI*.

Tab. 18: Velikosti štěpných fragmentů (v bp) získaných po restriční analýze

Pracovní označení	PCR	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>TaqI</i>
s102	880	320+240+180+140	360+120+50	300+280+140+100+60
s103	880	320+240+180+140	360+120+50	300+280+140+100+60
s104	880	500+240+150	360+120	300+280+140+100+60
s105	880	500+240+150	360+120	300+280+140+100+60
s106	880	320+240+180+140	360+120	300+280+140+100+60
s107	800	n	420+380	400+370+40

Tab. 18: Pokračování

Pracovní označení	PCR	<i>AluI</i>	<i>MseI</i>
s102	880	800+80	210+180+120+100+80+50+20
s103	880	800+80	210+180+120+100+80+50+20
s104	880	800+80	210+180+120+100+80+50+20
s105	880	800+80	210+180+120+100+80+50+20
s106	880	800+80	210+180+120+100+80+50+20
s107	800	600+110	210+160+140+120



Obr. 34: Ukázka štěpení DNA typových kvasinek endonukleázami *MseI* (vlevo) a *TaqI* (vpravo)

4.3 Taxonomické zařazení vyizolovaných kvasinek

K zařazení a určení kvasinek vyizolovaných z bobulí a moštu vinné révy byly použity nově zpracované typové kvasinky a typové kvasinky, které byly zpracovány v rámci minulých diplomových prací.

Vzorky č. 1, 4, 12, 13, 15, 20, 122, 140, 141, 143, 171 a 177 s délkou PCR fragmentu 880 bp, byly prokazatelně určeny jako rod *Saccharomyces*. Druhově se je však zařadit nepodařilo, protože námi zvolené restriční endonukleázy štěpily všechny vzorky na stejné fragmenty. Vzorky č. 128, 136 a 160/2, které měly délku PCR fragmentu 750 bp, byly určeny jako rod *Hanseniaspora*. Použitím enzymu *HaeIII* a srovnáním s typovými kvasinkami bylo možné tyto kvasinky zařadit i druhově, protože enzym *HaeIII* je neštěpí. Můžeme tedy říci, že se jedná o druh *Hanseniaspora uvarum*. Vzorky (č. 156, 161 a 97) s délkou PCR fragmentu 620 bp byly určeny jako rod *Rhodotorula*. I zde bylo možné zařadit tyto kvasinky druhově a to srovnáním s typovými kvasinkami a opět díky enzymu *HaeIII*, kterým nebyly štěpeny. Jde

tedy o druh *Rhodotorula glutinis*. Vzorky (24 vzorků) s velikostí PCR fragmentu 450 bp, byly určeny jako rod *Pichia*. Porovnáním s typovými kvasinkami bylo zjištěno, že se jedná o dva druhy, a to *Pichia membranifaciens* a *Pichia fermentans*. Vzorky č. 131 a 151 s velikostí PCR fragmentu 390 bp byly zařazeny jako rod *Metschnikowia*. Při porovnání s délkami restričních fragmentů typových kvasinek bylo zjištěno, že se jedná o druh *Metschnikowia pulcherrima*.

Tab. 19: Souhrnná tabulka zařazených kvasinek vyizolovaných z bobulí

Pracovní označení	Fragment PCR	Druh (Rod) kvasinky	
1	880	<i>Saccharomyces sp.</i>	
128	750	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
160/2	750		
97	620	<i>Rhodotorula glutinis</i>	
156	620		
161	620		
104	450	<i>Pichia fermentans</i>	
138	450		
145	450		
146	450		
147	450		
149	450		
69	450		
70	450		
90	450		
160	450		
190	450		
151	390		<i>Metschnikowia pulcherrima</i>

Tab. 20: Souhrnná tabulka zařazených kvasinek vyizolovaných z vinného moštu

den odběru	Pracovní číslo izolátu	fragment PCR	Druh (Rod) kvasinky
1.den	37	450	<i>Pichia fermentans</i>
1.den	39	450	<i>Pichia membranifaciens</i>
1.den	52	450	
1.den	116	450	
1.den	4	880	
1.den	171	880	<i>Saccharomyces sp.</i>
2.den	45	450	<i>Pichia membranifaciens</i>
2.den	144	450	
2.den	183	450	

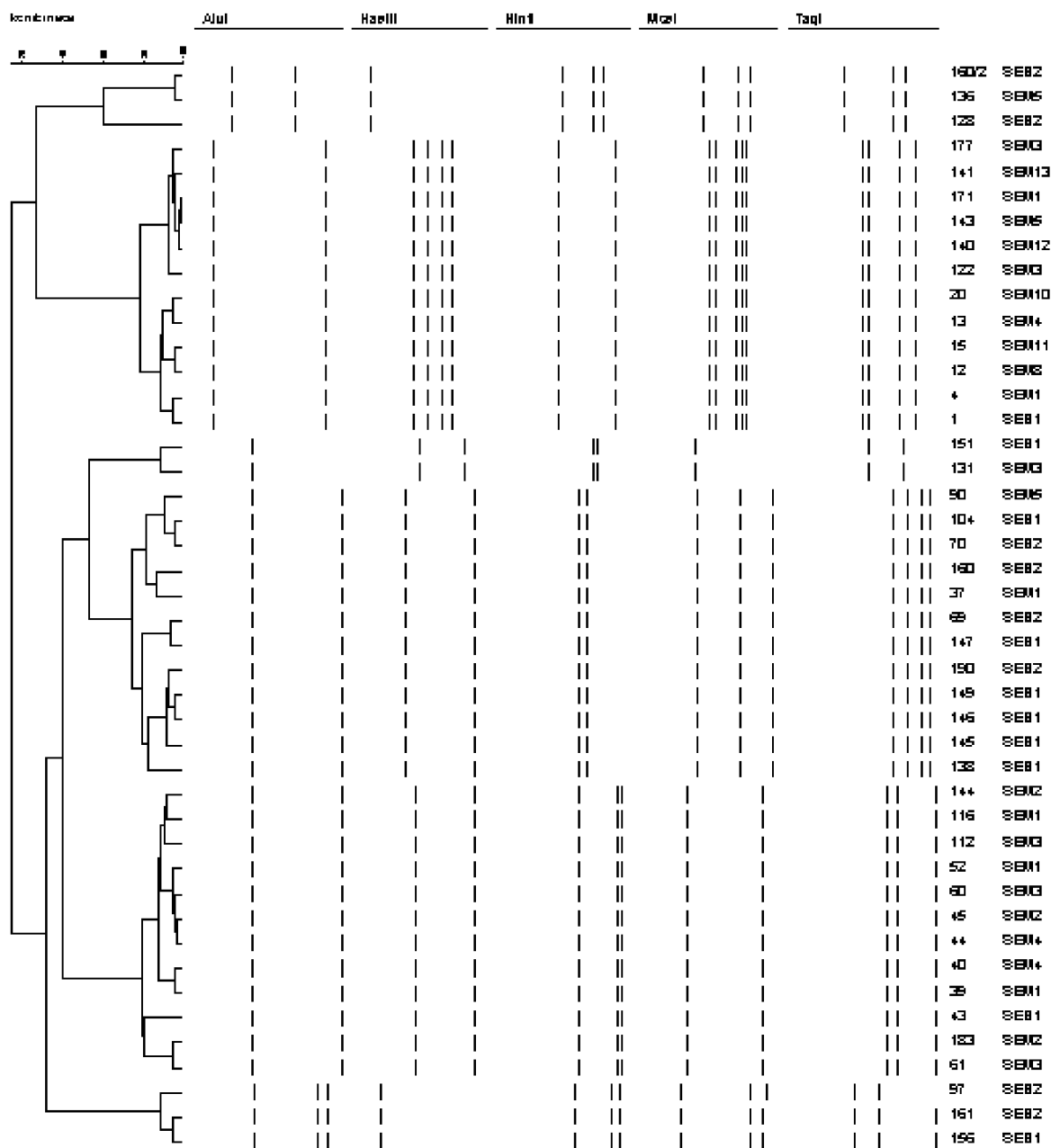
Tab. 20: Pokračování

4.den	131	390	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
4.den	60	450	<i>Pichia membranifaciens</i>
4.den	61	450	
4.den	112	450	
4.den	122	880	<i>Saccharomyces sp.</i>
4.den	177	880	
8.den	40	450	<i>Pichia membranifaciens</i>
8.den	44	450	
8.den	13	880	<i>Saccharomyces sp.</i>
9.den	43	450	<i>Pichia membranifaciens</i>
9.den	136	750	<i>Hanseniaspira uvarum</i>
9.den	143	880	<i>Saccharomyces</i>
16.den	12	880	<i>Saccharomyces sp.</i>
21.den	15	880	
31.den	20	880	
42.den	140	880	
52.den	141	880	

4.4 Dendrogram kvasinek izolovaných z vína

Dendrogram pro analyzované vzorky byl vytvořen použitím programu BioNumerics. Dendrogram byl sestaven na základě UPGMA klastrové analýzy a jako kritérium podobnosti byly zvoleny Pearsonovy koeficienty.

Z dendrogramu (Obr. 39) lze vyčíst, že námi vyizolovaných 44 kvasinek z bobulí a moštu vinné révy bylo, pomocí vybraných pěti endonukleáz, rozděleno do šesti skupin. Dále je vidět, že pomocí zvolených enzymů bylo možné druhově zařadit nejpočetnější skupinu kvasinek rodu *Pichia*. Kdežto kvasinky identifikované jako rod *Saccharomyces* (vzorky s č. 177, 141, 171, 143, 140, 122, 20, 13, 15, 4, 1) se těmito endonukleázami druhově zařadit nepodařilo.



Obr. 35: Dendrogram genetické podobnosti analyzovaných kvasinek sestavený na základě výsledků RFLP – pro enzymy AluI, HaeIII, HinfI, MseI a TaqI.

4.5 Alkoholová tolerance

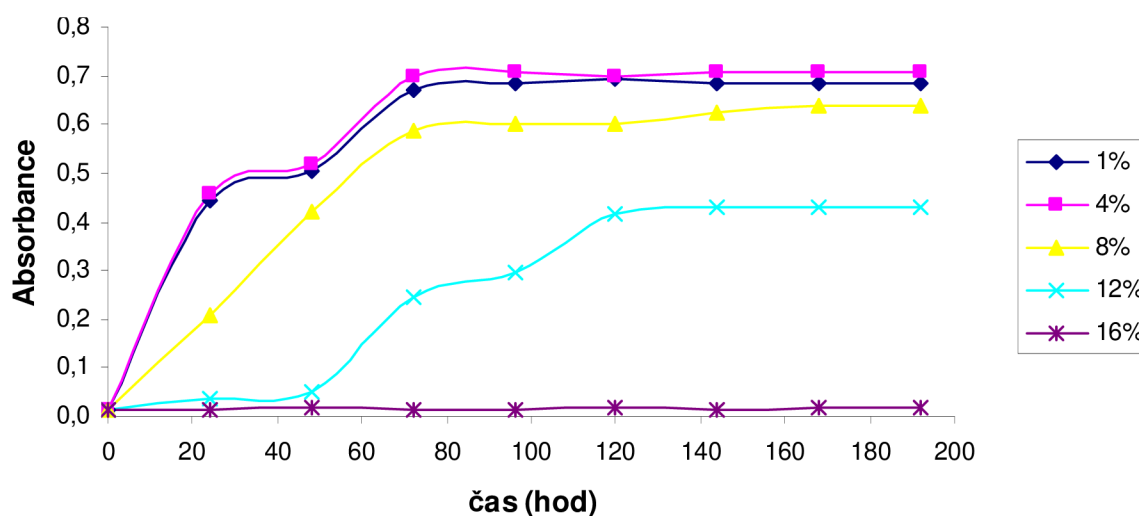
Test na alkoholovou toleranci byl proveden u šesti vybraných druhů kvasinek, vyizolovaných z moštu a bobulí vinné révy. Alkoholová tolerance byla sledována po dobu 240ti hodin při koncentraci ethanolu 1 %, 4 %, 8 %, 12 % a 16 %. Všechny naměřené hodnoty jsou uvedeny v samostatných tabulkách ke každému vzorku a souhrnná tabulka je uvedena v příloze 3. Průběh růstu buněk jednotlivých kvasinek je znázorněn v grafech.

4.5.1 Rod Saccharomyces

Z grafu (Obr. 36) je patrné, že tato kvasinka byla schopná života i při koncentraci ethanolu 12 %. Kvasinka byla nejvíce schopná rozmnožování při koncentraci ethanolu 1 %, kdy po 24 hod. výrazně vzrostla absorbance a po 72 hod. kultivace se její nárůst ustálil. Stejný průběh růstu byl i při koncentraci ethanolu 4 %. V médiu s obsahem 8 % ethanolu byl nárůst buněk této kvasinky velmi pozvolný a opět po 72 hod. kultivace se její nárůst ustálil. Ve směsi, která obsahovalo 12 % ethanolu, tato kvasinka narostla až po 72 hod. kultivaci. Další vyšší nárůst byl po 120 hod. kultivace, poté se růst téměř zastavil. Při 16% koncentraci ethanolu i tato kvasinka přežívala, ale ve velmi malém počtu.

Tab. 21: Naměřené hodnoty absorbance pro vzorek č. 140

obj. % EtOH	absorbance								
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h
1	0,016	0,444	0,504	0,672	0,684	0,692	0,684	0,684	0,684
4	0,015	0,456	0,516	0,696	0,708	0,698	0,708	0,708	0,709
8	0,013	0,207	0,420	0,588	0,600	0,600	0,624	0,636	0,636
12	0,016	0,037	0,053	0,246	0,294	0,414	0,432	0,432	0,432
16	0,015	0,016	0,017	0,016	0,016	0,017	0,015	0,017	0,017



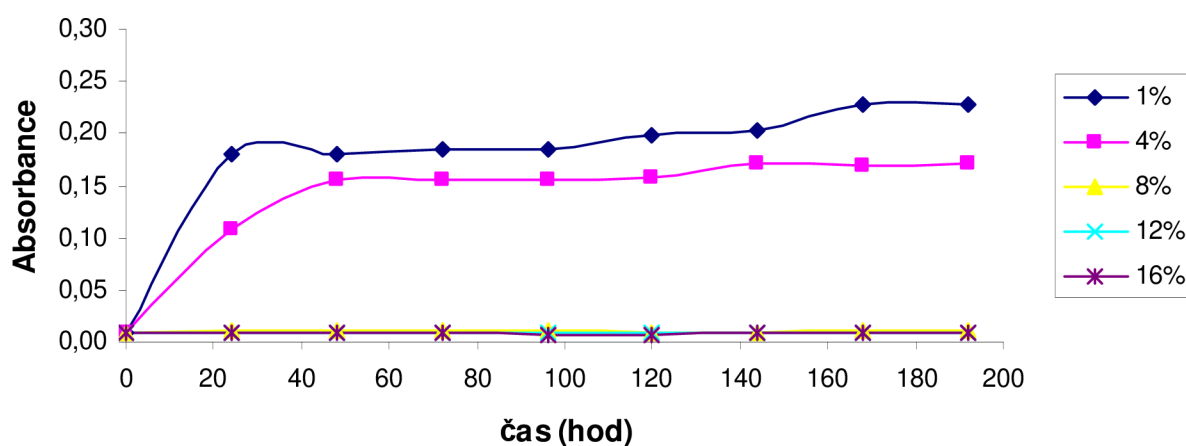
Obr. 36: Graf alkoholové tolerance vzorku č. 140

4.5.2 Rod Hanseniaspora

Tato kvasinka byla schopná života při koncentraci ethanolu 1 % a 4 %. Ve směsi s obsahem ethanolu 1 % byl nárůst buněk hned po 24 hod., poté se zvyšoval jen málo a další nárůst byl zaznamenán po 168 hod. kultivaci. Při koncentraci ethanolu 4 % byl zaznamenán vyšší nárůst buněk po 24 a 48 hod., poté byl jejich nárůst velmi pozvolný. Při koncentracích ethanolu 8 %, 12 % a 16 % se dá říct, že tato kvasinka byla schopná pouze přežít.

Tab. 22: Naměřené hodnoty absorpance pro vzorek č. 136

obj.% EtOH	absorbance								
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h
1	0,009	0,180	0,180	0,186	0,186	0,198	0,204	0,228	0,228
4	0,010	0,109	0,156	0,156	0,156	0,159	0,171	0,170	0,171
8	0,009	0,011	0,012	0,012	0,012	0,009	0,009	0,011	0,012
12	0,010	0,009	0,009	0,009	0,008	0,008	0,009	0,009	0,009
16	0,008	0,009	0,009	0,009	0,007	0,007	0,008	0,009	0,008



Obr. 37: Graf alkoholové tolerance vzorku č. 136

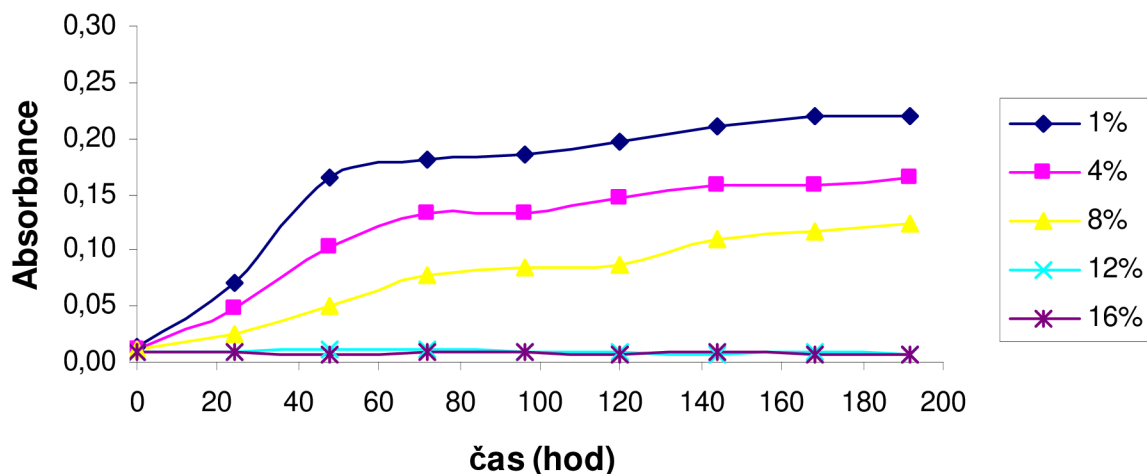
4.5.3 Rod *Pichia*

Z výše popsané restriční analýzy bylo zjištěno, že byly vyizolovány dva druhy kvasinek rodu *Pichia*. To bylo potvrzeno i testem na alkoholovou toleranci, kdy každý druh této kvasinky byl jinak odolný vůči etanolu.

Z grafu kvasinky s č. 60 je vidět, že byla schopná života při koncentracích ethanolu 1 %, 4 % a 8 %. Při koncentraci 1 % byl nárůst buněk po 24 hod. kultivace a další velký skok byl po 48 hod. kultivace, poté se množství buněk této kvasinky zvyšovalo jen málo. Velmi podobný průběh nárůstu byl i v médiích s koncentrací ethanolu 4 % a 8 %. V roztocích s koncentrací ethanolu 12 % a 16 % kvasinky nerostly.

Tab. 23: Naměřené hodnoty absorpance pro vzorek č. 60

obj.% EtOH	absorbance								
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h
1	0,013	0,071	0,165	0,180	0,186	0,198	0,210	0,219	0,219
4	0,011	0,048	0,102	0,132	0,132	0,147	0,159	0,159	0,165
8	0,011	0,025	0,051	0,077	0,084	0,088	0,111	0,117	0,123
12	0,010	0,010	0,011	0,011	0,009	0,009	0,008	0,009	0,008
16	0,010	0,010	0,008	0,009	0,010	0,008	0,009	0,008	0,008

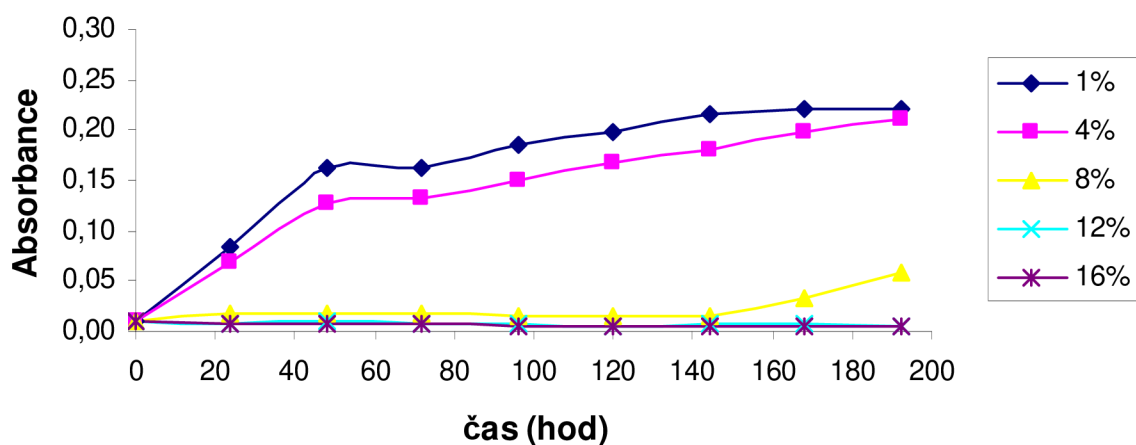


Obr. 38: Graf alkoholové tolerance vzorku č. 60

Z grafu kvasinky č. 149 vyplývá, že byla schopná života pouze při koncentracích ethanolu 1 % a 4 % a tudíž byla méně odolná vůči ethanolu, než předchozí kvasinka s č. 60. V obou případech byl nárůst buněk nejvyšší po 24 a 48 hod. kultivace, poté množství buněk narůstalo velmi pozvolna. V médiích s obsahem ethanolu 8 %, 12 % a 16 % bylo množství buněk kvasinky rodu *Pichia* minimální.

Tab. 24: Naměřené hodnoty absorbance pro vzorek č. 149

obj.% EtOH	absorbance									
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	
1	0,011	0,084	0,162	0,162	0,186	0,198	0,216	0,222	0,222	
4	0,011	0,068	0,126	0,132	0,150	0,168	0,180	0,198	0,210	
8	0,010	0,017	0,017	0,017	0,015	0,015	0,016	0,017	0,015	
12	0,009	0,007	0,009	0,007	0,007	0,006	0,007	0,007	0,005	
16	0,010	0,007	0,008	0,008	0,006	0,006	0,006	0,005	0,006	



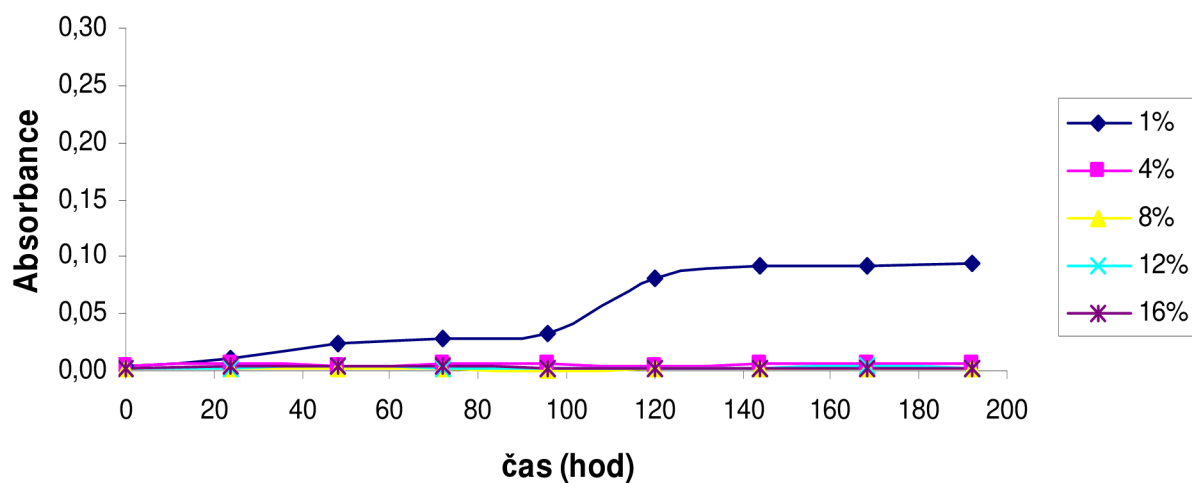
Obr. 39: Graf alkoholové tolerance vzorku č. 149

4.5.4 Rod *Rhodotorula*

Kvasinka tohoto rodu byla schopná života pouze v médiu s koncentrací ethanolu 1 %. Její výrazný nárůst byl zaznamenán po 120 hod. kultivace, potom bylo množství buněk přibližně stejné. Tento nárůst byl způsoben adaptací kvasinky na ethanol, protože ethanol může působit jako stresové prostředí. Při koncentraci ethanolu 4 %, 8 %, 12 % a 16 % byla životnost této kvasinky minimální.

Tab. 25: Naměřené hodnoty absorbance pro vzorek č. 161

obj. % EtOH	absorbance								
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h
1	0,004	0,012	0,023	0,028	0,032	0,082	0,093	0,093	0,094
4	0,005	0,006	0,005	0,006	0,007	0,005	0,006	0,006	0,006
8	0,003	0,002	0,002	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	0,003
12	0,003	0,003	0,004	0,003	0,003	0,003	0,003	0,004	0,002
16	0,003	0,004	0,004	0,004	0,003	0,003	0,003	0,003	0,002



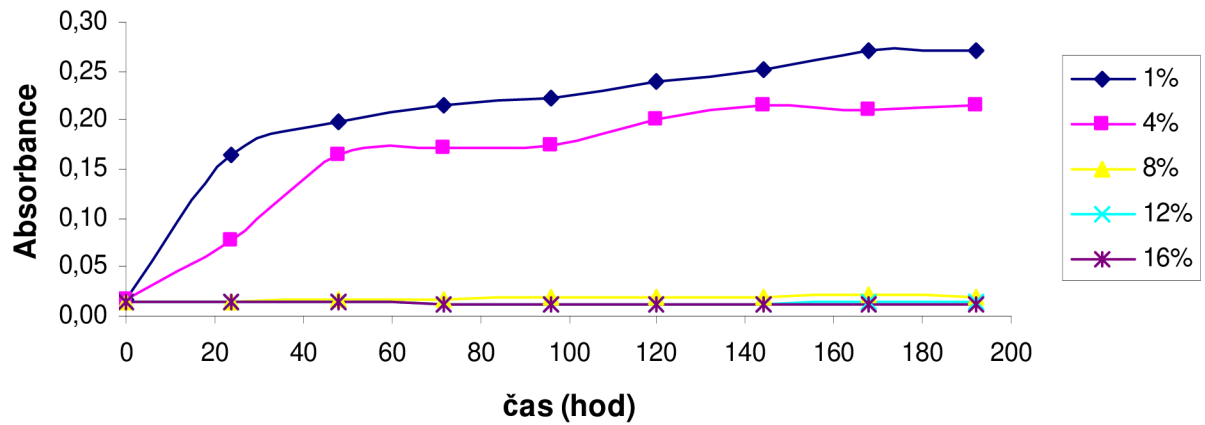
Obr. 40: Graf alkoholové tolerance vzorku č. 161

4.5.5 Rod *Metschnikowia*

Množství buněk této kvasinky ve vzorku vzrostlo viditelně po 24 hod. kultivace a poté byl její nárůst velmi pozvolný. Tento průběh byl zaznamenán ve vzorcích s obsahem ethanolu 1 % a 4 %. Kvasinka nerostla v médiích s koncentrací ethanolu 8 %, 12 % a 16 %.

Tab. 26: Naměřené hodnoty absorpance pro vzorek č. 131

obj.% EtOH	absorbance								
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h
1	0,017	0,165	0,198	0,216	0,222	0,240	0,252	0,270	0,270
4	0,017	0,077	0,165	0,171	0,174	0,201	0,215	0,210	0,216
8	0,015	0,015	0,017	0,018	0,019	0,020	0,020	0,021	0,020
12	0,014	0,015	0,014	0,013	0,013	0,012	0,013	0,014	0,014
16	0,014	0,014	0,014	0,012	0,013	0,011	0,011	0,013	0,012



Obr. 41: Graf alkoholové tolerance vzorku č. 131

5 ZÁVĚR

Náplní této diplomové práce byla identifikace kvasinek vyizolovaných z bobulí a moštu bílého vína Sauvignon, které bylo pěstováno podle pravidel ekologického zemědělství. V první části práce bylo nutné kvasinky nakultivovat a vyizolovat. Poté byla vyizolována DNA jednotlivých kvasinek a to pomocí komerčního kitu UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit. Takto vyizolovaná DNA byla amplifikována metodou PCR za použití sady dvou primerů ITS1 a ITS4 a dalších potřebných komponent. Po amplifikaci bylo získáno pět skupin kvasinek (o délkách fragmentů 880 bp, 750 bp, 620 bp, 450 bp a 390 bp), které byly podrobeny restriční analýze. Jednotlivé vzorky pro restriční analýzu byly nejprve přečištěny, aby se odstranily nežádoucí inhibitory reakce a teprve poté byla provedena restriční analýza, ke které bylo použito pět restričních endonukleáz, a to *HaeIII*, *HinfI*, *TaqI*, *AluI* a *MseI*.

Aby bylo možné získané fragmenty DNA vyizolovaných kvasinek zařadit, byly také analyzovány typové kvasinky, které pocházely ze sbírky kvasinek CCY z ChÚ SAV v Bratislavě. Jejich DNA byla vyizolována a analyzována stejným způsobem jako DNA kvasinek vyizolovaných z bobulí a moštu vinné révy, přičemž k restriční analýze, kromě již zmíněných endonukleáz, byly použity ještě další dvě restriční endonukleázy, kterými byly endonukleázy *HhaI* a *HpaII*. Protože v rámci této diplomové práce bylo izolováno pouze 12 druhů typových kvasinek, byly vyizolované kvasinky porovnávány s typovými kvasinkami, které byly zpracovány v rámci minulých diplomových prací.

Porovnáním vyizolovaných kvasinek s typovými kvasinkami, po amplifikaci metodou PCR bylo zjištěno, že analyzované matrice obsahovaly pět rodů kvasinek: *Saccharomyces*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Rhodotorula* a *Hanseniaspora*. Restriční analýzou bylo zjištěno, že se v matici nachází dva druhy rodu *Pichia*. Porovnáním s typovými kvasinkami bylo možné určit, že se jedná o druhy *Pichia membranifaciens* a *Pichia fermentans*. Restriční analýzou kvasinek rodu *Saccharomyces* měly vzniklé fragmenty stejné délky. Porovnáním s typovými kvasinkami bylo zjištěno, že některé druhy rodu *Saccharomyces* se štěpí na stejné fragmenty, a proto nebylo možné tento rod zařadit druhově. Rody *Metschnikowia*, *Hanseniaspora* a *Rhodotorula* bylo možné zařadit druhově. K porovnání byly opět použity typové kvasinky. V matici se nacházely druhy *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora uvarum* a *Rhodotorula glutinis*.

Jak již bylo popsáno výše, kvasinky byly izolovány z bobulí a moštu vinné révy bílého ekologicky pěstovaného vína. Na bobulích bylo nalezeno pět druhů kvasinek. Jsou to druhy *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia fermentans*, *Rhodotorula glutinis*, *Hanseniaspora uvarum* a rod *Saccharomyces*. Vinný mošt byl odebírán postupně a v každém odběru se nalezené kvasinky trochu lišily. Kvasinka druhu *Pichia fermentans* byla nalezena pouze v odběru z 1. dne kvasného procesu, kdežto kvasinky druhu *Pichia membranifaciens* byly nalezeny v odběrech z 1., 2., 4., 8. a 9. dne kvasného procesu. Druh *Metschnikowia pulcherrima* byl nalezen pouze v odběru ze 4. dne kvasného procesu a druh *Hanseniaspora uvarum* byl pouze v odběru z 9. dne kvasného procesu. Rod *Saccharomyces* byl nalezen v každém odběru, kromě odběru z 2. dne kvasného procesu.

Provedením testu na alkoholovou toleranci byla zjištěna schopnost tolerance vyizolovaných druhů kvasinek na ethanol. Nejvyšší tolerance na ethanol byla stanovena u rodu *Saccharomyces*, který byl schopen růstu i při koncentraci ethanolu 12 obj. %. Nejnižší

toleranci na ethanol byl zjištěn u druhu *Rhodotorula glutinis*, který byl schopen života pouze při koncentraci ethanolu 1 obj.‰.

6 LITERATURA

- [1] Pokorný, P. *Tradiční vinařství na Moravě*. Mikulov: Regionální muzeum Mikulov. 2000. 94 s.
- [2] Loskotová, M.: *Využití kvasinkovitých mikroorganismů v moderních biotechnologiích* [online]. Přírodovědecká fakulta MU. Brno 2005. [cit. 2009-01-20], <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/spustit.html>>
- [3] Boekhout, T.; Robert, V.: *Yeasts in food*. Cambridge England: Woodhead Publishing Ltd, 2003. 487 p. ISBN 1 85573 706 X.
- [4] Šmarda, J., Doškař, J., Pantíček, R., Růžičková, V., Kostíková, J.: *Metody molekulární biologie*. 1.vyd. Brno: MU v Brně. 2005. 188 s. ISBN 80-210-3841-1
- [5] Görner, F., Valík, L. *Aplikovaná mikrobiologie poživatin*. 1. vyd. Bratislava: MALÉ CENTRUM. 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7
- [6] Kocková-Kratochvílová, A. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganismov*. 1.vyd. Bratislava: ALFA. 1990. 704 s. ISBN 80-05-00644-6
- [7] Kocková-Kratochvílová, A. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy*. 1.vyd. Bratislava: ALFA. 1982. 488 s.
- [8] Farkaš, J., *Biotechnológia vína*. 2. přeprac. vyd. Bratislava: ALFA. 1983. 984 s.
- [9] Veselá, M., Drdák, M.: *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 2. přeprac. vyd. Brno: VUT v Brně, FCH. 1999. 88 s. ISBN 80-214-1305-0)
- [10] Švejcar, V., Minárik, E. *Vinařství. Mikrobiologie hroznů a vína*. 2. přeprac. vyd. Brno: Vysoká škola zemědělská v Brně. 1981. 99 s.
- [11] Kocková-Kratochvílová, A. *Kvasinky*. 1.vyd. Bratislava: Slovenské vydavateľstvo technickej literatury. 1957. 344 s.
- [12] Vraná, D.: *Kvasinky ve výzkumu a praxi*. 1.vyd. Praha: Academia. 1986. 376 s. ISBN
- [13] Šipický, M., Šubík, J.: *Genetika kvasiniek*. 1. vyd. Bratislava: VEDA. 1992. 312 s. ISBN 80-224-0396-2
- [14] Šilhánková, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd., oprav. Praha: Academia. 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6
- [15] Elektronická verze k tištěné publikaci: Kodíček, M.: *Biochemické pojmy - výkladový slovník*, ISBN 80-7080-551-X [on line]. cit. 8.duben 2010 Dostupné z: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/mitochondrie.html>

- [16] Klaban, V.: *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1.vyd. Praha: Galén. 2005. 654 s. ISBN 80-7262-341-9]
- [17] *Miniatlas mikroorganismů*. [on line]. cit. 8.duben 2010 Dostupné z: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/termin.htm>>
- [18] *Miniatlas mikroorganismů*. [on line]. cit. 24.duben 2010 Dostupné z: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/images/kvasinky/mikro/>>
- [19] *Galerie mikroorganismů*. [on line]. cit. 24.duben 2010 Dostupné z: <<http://www.vscht.cz/kch/galerie/obrazky/kvasinky/>>
- [20] Molnár, O., Prillinger, H.: *Analysis of yeast isolates related to Metschnikowia pulcherrima using the partial sequences of the large subunit rDNA and the actin gene; description of Metschnikowia andauensis sp. nov.* Systematic and Applied Microbiology. 2005. vol 28. pp. 717-726
- [21] Janderová, B., Bendová, O.: *Úvod do biologie kvasinek*. 1.vyd. Praha. Karolinum. 1999. 108 s. ISBN 80-7184-990-1
- [22] Fugelsang, K. C., Edwards, Ch. G.: *Wine mikrobiology. Practical Applications and Procedures*. 2. vyd. New York: Springer. 2007. 392 s. ISBN 0-387-33341-x
- [23] Drdák, M., Studnický, J., Mórová, E., Karovičová, J.: *Základy potravinářských technologií*. 1.vyd. Bratislava: MALÉ CENTRUM. 1996. 512 s. ISBN 80-967064-1-1
- [24] Raspor, P., Cus, F., Jemec, K. P., Zagorc, T., Cadez, N., Nemanic, J.: *Yeast population dynamics in spontaneous and inoculated alcoholic fermentations of Zametovka must*. Food Technik. Biotechnik. 40. 2002. ISSN 1330-9862.
- [25] Querol, A., Fernández-Espinar, M. T., Olmo, M., Barrio, E.: *Adaptive evolution of wine yeast*. International Journal of Food Microbiology. 2003. vol. 86. pp. 3-10.
- [26] Farkaš, J.: *Technologie a biochemie vína*. 2. vyd. Bratislava: ALFA. 1980. 872 s.
- [27] Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganza, A., Martinez, C.: *Dynamics of indigenous yeast population during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina*. International Journal of Food Microbiology. 2005. vol. 99. pp-237-243.
- [28] Čepička, J. a kolektiv.: *Obecná potravinářská technologie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995. 246 s. ISBN 80-7080-239-1
- [29] Pelikán, M., Dudáš, F., Míša, D.: *Technologie kvasného průmyslu*. 1. vyd. Brno: Mendlova a zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 1996. 135 s.

ISBN 80-7157-240-3

- [30] Kadlec, P.: *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2007. 236 s. ISBN 80-7080-510-2
- [31] *Moderní technologie výroby vína*. [online]. cit. 4. březen 2010 Dostupné z: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/vinkvas/modtech/modtech.html>>
- [32] Fleet, G.H.: *Yeast interactions and wine flavour*. International Journal of Food Microbiology. 2003. vol. 86. pp. 11-22.
- [33] Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A.: *Function of yeast species and strains wine flavour*. International Journal of Food Microbiology. 2003. vol. 86. pp. 169-180.
- [34] Ševčík, L., *Hledání pravdy o víně. Bílá vína*, 1. vyd. Praha: Grada Publishing. 1999. 144s. ISBN 80-7169-754-0
- [35] Kuttelvašer, Z. *Abeceda vína*. 2. vyd. Praha: Radix. 2003. 280 s. ISBN 80-86031-43-8
- [36] Oficiální webové stránky Ministerstva zemědělství. [online]. cit. 18. březen 2010 Dostupné z: <<http://eagri.cz/public/eagri/zemedelstvi/ekologicke-zemedelstvi/>>
- [37] Biotechnologický portál *Gate2Biotech* [online]. cit. 18. březen 2010, ISSN 1802-2685 Dostupné z: <<http://www.gate2biotech.cz/pruvodce-biospotrebitele-biovino/>>
- [38] Zákon č. 242/2000 Sb. o ekologickém zemědělství a nařízení rady (EHS) č. 2092/91 [online]. cit. 19. březen 2010 Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/UserFiles/File/Zk242+NR2092_kons4-07%20int-titl_Barva.pdf>
- [39] Vytrásová, J., Bílková, Z.: *Laboratorní cvičení z obecné mikrobiologie*. 1. vyd. Pardubice: Univerzita Pardubice. 1999. 140 s. ISBN 80-7194-174-3.
- [40] Demnerová, K. a kolektiv. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. 3. vyd. přeprac. Praha: VŠCHT v Praze. 2001. 179 s. ISBN 80-7080-415-7.
- [41] Bílková, K., Králová, B.: *Izolace biomakromolekul*. 1. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT. 1997. 206 s. ISBN 80-7080-288-X.
- [42] *Přehled metod molekulární biologie využívaných v patofyziologii*. [online] cit. 19. duben 2010 Dostupné z: <<http://www.med.muni.cz/patfyz/biotech/praktika/molbiol.pdf>>
- [43] Senses-Ergul, S., Ágoston, R., Belák, Á., Deák, T.: *Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests*. International Journal of Food

Microbiology. 2005.

- [44] Chavan, P., Mane, S., Kulkarni, G., Shaikh, S., Ghormade, V., Nerkar, D.P., Shouche, Y., Deshpande, M.V.: *Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India..* Food Microbiology. 2009. vol. 26. pp. 801-808.
- [45] Ruml, T., Rumlová, M., Pačes, V. *Genové inženýrství*. 1.vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha.2007. 270 s. ISBN 978-80-7080-499-5
- [46] Fernández, M., Úbeda, J. F., Briones, A.I.: *Tyliny of non-Saccharomyces yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making.* International Journal of Food Microbiology. 2000. vol. 59. pp. 29-36.
- [47] Králová, B., Fukal, L., Rauch, P., Ruml, T. *Bioanalytické metody*. 3.vyd. přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha.2004. 254 s. ISBN 80-7080-449-1
- [48] Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Walter, P., Roberts, K., Raff, M.: *Základy buněčné biologie*. 2.vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, s r.o. ISBN 80-902906-2-0.
- [49] Zima, J., Macholán, M., Munclinger, P., Piálek, P.: *Genetické metody v zoologii*. 1.vyd. Praha: Karolinum. 2004. 239 s. ISBN 80-246-0795-6
- [50] Heras-Vazquez, F. J., Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jimenez, J. M., Rodriguez-Vico, F.: *Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8 rRNA gene and the two internal transcribed spacers.* FEMS Yeast Research. 2003. vol. 3. pp.3-9
- [51] Průša, R.; Lány, J.; Vvejvalka, J.; Karger, V.; Kotaška, K: *Multimediální učebnice DNA diagnostiky*. 1. vydání. Praha: 2. lékařská fakulta UK. 1998. Dostupné z: <<http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-DNA/>>
- [52] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Nakladatelství Pavel Klouda. Ostrava: 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [53] Churáček, J.: *Pokroky v teorii a instrumentaci moderních analytických metod*. 2. vyd. VŠCHT Pardubice: 1988. 193 s. Učební texty VŠCHT v Pardubicích.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

°ČNM	český normalizovaný moštoměr
A	adenin
A-T	adenin-tyminový můstek
ATPáza	enzym štěpící ATP
bp	base pair
C	cytosin
CCY	colection culture yeasts
dATP	deoxyadenosin trifosfát
dCTP	deoxycytidin trifosfát
dGTP	deoxyguanosin trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
dsDNA	dvouřetězcová DNA
dTTP	deoxythymidin trifosfát
EDTA	ethyldiamintetraoctová kyselina
G	guanin
G-C	guanin-cytosinový můstek
ChÚ	Chemický Ústav
ITS	vnitřní přepisová oblast (internal trascribed spacer)
kb	kilo base
mRNA	mediátorová RNA
mtDNA	mitochondriální DNA
NK	negativní kontrola
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
RFLP	polymorfismus délky restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
RNA	ribonukleová kyselina
SAV	Slovenská akadémia ved
T	thymin
TBE	tris-borátový pufr
tRNA	transferová RNA
UV	ultrafialové záření
V	jednotka napětí

8 SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA 1: DÉLKY FRAGMENTŮ DNA PO RESTRIKČNÍ ANALÝZE VZORKŮ IZOLOVANÝCH Z VÍNA	76
PŘÍLOHA 2: DÉLKA FRAGMENTŮ DNA PO RESTRIKČNÍ ANALÝZE TYPOVÝCH KVASINEK.....	79
PŘÍLOHA 3: TURBIDIMETRICKY NAMĚŘENÉ HODNOTY PRO ALKOHOLOVOU TOLERANCI	80
PŘÍLOHA 4: ELEKTROFOREOGRAMY DNA KVASINEK IZOLOVANÝCH Z BOBULÍ A MOŠTU VINNÉ RÉVY PO REAKCI PCR A RESTRIKČNÍ ANALÝZE	81
PŘÍLOHA 5: ELEKTROFOREOGRAMY DNA TYPOVÝCH KVASINEK PO REAKCI PCR A RESTRIKČNÍ ANALÝZE	88

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Délky fragmentů DNA po restrikční analýze vzorků izolovaných z vína

Tabulka 1: Souhrnná tabulka délky restrikčních fragmentů získaných štěpením amplifikované DNA s délkou PCR fragmentu 450 bp

Číslo izolátu	PCR	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Mse</i> I	
183	SEM2	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
39	SEM1	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
40	SEM4	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
61	SEM3	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
43	SEM5	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
44	SEM4	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
45	SEM2	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
52	SEM1	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
60	SEM3	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
112	SEM3	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
116	SEM1	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
144	SEM2	450	310+90	260+115+105	190+160+60	410+50	360+50
69	SEB2	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
190	SEB2	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
160	SEB2	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
37	SEM1	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
138	SEB1	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
145	SEB1	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
146	SEB1	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
147	SEB2	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
149	SEB1	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
70	SEB2	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
104	SEB1	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50
90	SEB1	450	390+90	250+210	180+140+90+75	410+50	290+120+50

Tabulka 2: Souhrnná tabulka délky restrikčních fragmentů získaných štěpením amplifikované DNA s délkou PCR fragmentu 750 bp

Číslo izolátu		PCR	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Mse</i> I
128	SEB2	750	n	350+200+160	400+170+130	280+190	250+120+100+90
136	SEM5	750	n	350+200+160	400+170+130	280+190	250+120+100+90
160/2	SEB2	750	n	350+200+160	400+170+130	280+190	250+120+100+90

Tabulka 3: Souhrnná tabulka délky restrikčních fragmentů získaných štěpením amplifikované DNA s délkou PCR fragmentu 620 bp

Číslo izolátu		PCR	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Mse</i> I
156	SEB1	620	n	280+130+110	340+220+65	390+110+90	400+90+60
161	SEB2	620	n	280+130+110	340+220+65	390+110+90	400+90+60
97	SEB2	620	n	280+130+110	340+220+65	390+110+90	400+90+60

Tabulka 4: Souhrnná tabulka délky restrikčních fragmentů získaných štěpením amplifikované DNA s délkou PCR fragmentu 390 bp

Číslo izolátu		PCR	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Mse</i> I
131	SEM3	390	280+90	190+180	290+150	n	290+50
151	SEB1	390	280+90	190+180	290+150	n	290+50

Tabulka 5: Souhrnná tabulka délky restričních fragmentů získaných štěpením amplifikované DNA s délkou PCR fragmentu 880 bp

Číslo izolátu		PCR	<i>Hae</i> III	<i>Hin</i> fI	<i>Taq</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Mse</i> I
1	SEB1	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
4	SEM1	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
12	SEM8	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
13	SEM4	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
15	SEM11	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
20	SEM10	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
122	SEM3	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
140	SEM12	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
141	SEM13	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
143	SEM5	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
171	SEM1	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100
177	SEM3	880	320+240+180+140	370+120	290+265+145+100	820+90	230+220+130+110+100

Příloha 2: Délka fragmentů DNA po restrikční analýze typových kvasinek

Tabulka 6: Souhrnná tabulka délky restrikčních fragmentů získaných štěpením amplifikované DNA typových kvasinek

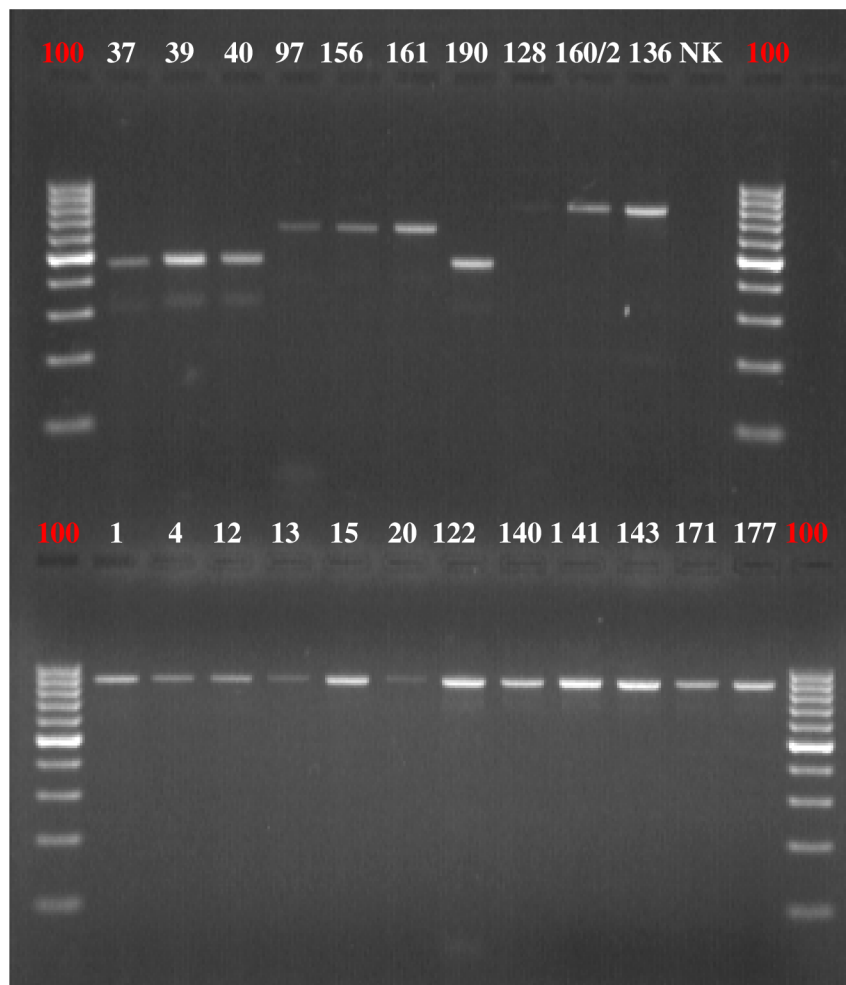
Číslo	PCR	<i>Hae</i> III	<i>Hin</i> fI	<i>Taq</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Mse</i> I	<i>Hha</i> I	<i>Hpa</i> II
s96	550	400+100	240+170+155	250+120+70	380+140	500+20	230+200+90+75	270
s97	650	420+220	360+220+70	240+190+70	450+220+50	200+160+120	330+250+115	500+115
s98	660	450+90+70	290+210+190	230+200+90+70	480+220+50	270+100	270+220+110	600
s99	500	n	240+240	270+190+80	n	220+120+90+60	250+190+90	260+220
s100	650	n	220+130+100+50	-	-	420+50	320+230	620
s101	550	400+100	240+170+150	230+120+80	380+150	500+20	220+180+80+65	260
s102	880	320+240+180+140	360+120+50	300+280+140+100+60	800+80	210+180+120+100+80+50+20	370+340+140	720+130
s103	880	320+240+180+140	360+120+50	300+280+140+100+60	800+80	210+180+120+100+80+50+20	370+340+140	720+130
s104	880	500+240+150	360+120	300+280+140+100+60	800+80	210+180+120+100+80+50+20	340+315+130	720+130
s105	880	500+240+150	360+120	300+280+140+100+60	800+80	210+180+120+100+80+50+20	340+315+130	720+130
s106	880	320+240+180+140	360+120	300+280+140+100+60	800+80	210+180+120+100+80+50+20	340+315+130	720+130
s107	800	n	420+380	400+370+40	600+110	-	320+220+140+100	-

Příloha 3: Turbidimetricky naměřené hodnoty pro alkoholovou toleranci

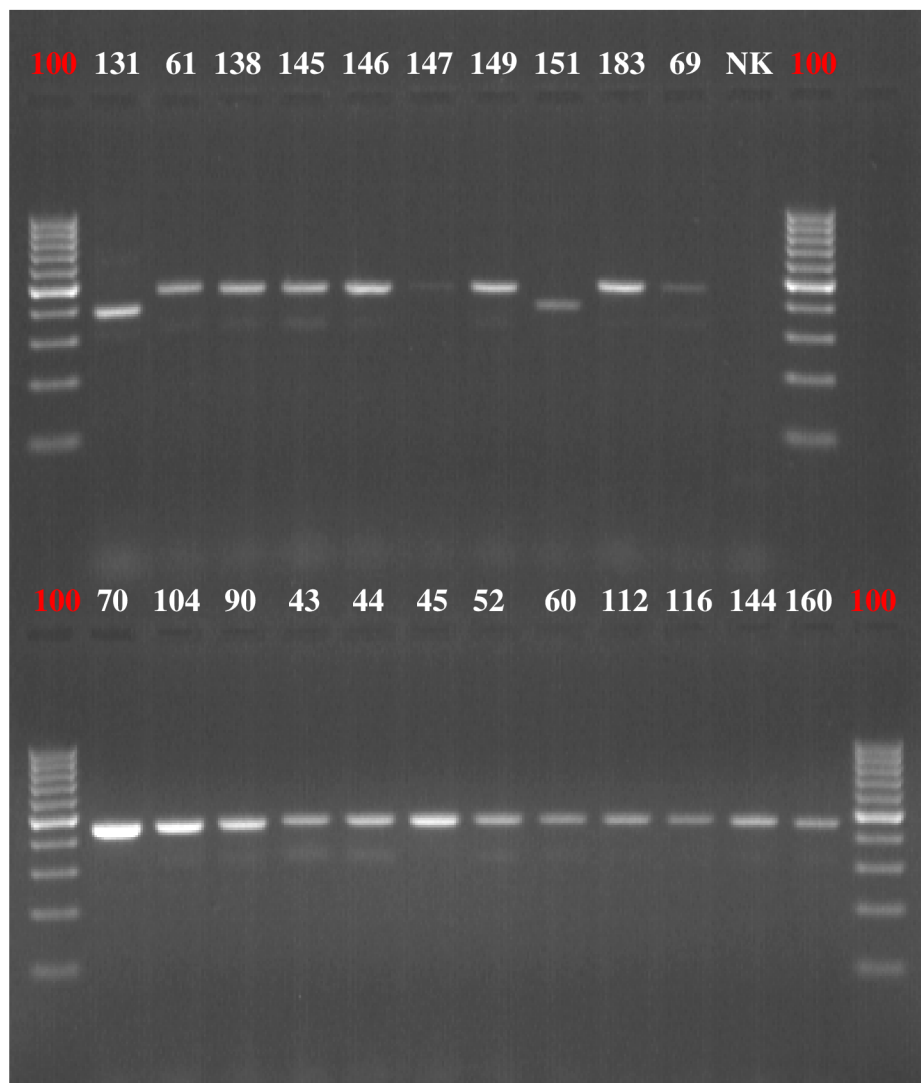
Tabulka 7: Souhrnná tabulka naměřených hodnot pro alkoholovou toleranci

č. vzorku	obj.% EtOH	měření absorbance (hod)								
		0	24	48	72	96	120	144	168	192
140	1	0,016	0,444	0,504	0,672	0,684	0,692	0,684	0,684	0,684
	4	0,015	0,456	0,516	0,696	0,708	0,698	0,708	0,708	0,709
	8	0,013	0,207	0,420	0,588	0,600	0,600	0,624	0,636	0,636
	12	0,016	0,037	0,053	0,246	0,294	0,414	0,432	0,432	0,432
	16	0,015	0,016	0,017	0,016	0,016	0,017	0,015	0,017	0,017
136	1	0,009	0,180	0,180	0,186	0,186	0,198	0,204	0,228	0,228
	4	0,010	0,109	0,156	0,156	0,156	0,159	0,171	0,170	0,171
	8	0,009	0,011	0,012	0,012	0,012	0,009	0,009	0,011	0,012
	12	0,010	0,009	0,009	0,009	0,008	0,008	0,009	0,009	0,009
	16	0,008	0,009	0,009	0,009	0,007	0,007	0,008	0,009	0,008
60	1	0,013	0,071	0,165	0,180	0,186	0,198	0,210	0,219	0,219
	4	0,011	0,048	0,102	0,132	0,132	0,147	0,159	0,159	0,165
	8	0,011	0,025	0,051	0,077	0,084	0,088	0,111	0,117	0,123
	12	0,010	0,010	0,011	0,011	0,009	0,009	0,008	0,009	0,008
	16	0,010	0,010	0,008	0,009	0,010	0,008	0,009	0,008	0,008
149	1	0,011	0,084	0,162	0,162	0,186	0,198	0,216	0,222	0,222
	4	0,011	0,068	0,126	0,132	0,150	0,168	0,180	0,198	0,210
	8	0,010	0,017	0,017	0,017	0,015	0,015	0,016	0,033	0,059
	12	0,009	0,007	0,009	0,007	0,007	0,006	0,007	0,007	0,005
	16	0,010	0,007	0,008	0,008	0,006	0,006	0,006	0,005	0,006
161	1	0,004	0,012	0,023	0,028	0,032	0,082	0,093	0,093	0,094
	4	0,005	0,006	0,005	0,006	0,007	0,005	0,006	0,006	0,006
	8	0,003	0,002	0,002	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	0,003
	12	0,003	0,003	0,004	0,003	0,003	0,003	0,003	0,004	0,002
	16	0,003	0,004	0,004	0,004	0,003	0,003	0,003	0,003	0,002
131	1	0,017	0,165	0,198	0,216	0,222	0,240	0,252	0,270	0,270
	4	0,017	0,077	0,165	0,171	0,174	0,201	0,215	0,210	0,216
	8	0,015	0,015	0,017	0,018	0,019	0,020	0,020	0,021	0,020
	12	0,014	0,015	0,014	0,013	0,013	0,012	0,013	0,014	0,014
	16	0,014	0,014	0,014	0,012	0,013	0,011	0,011	0,013	0,012

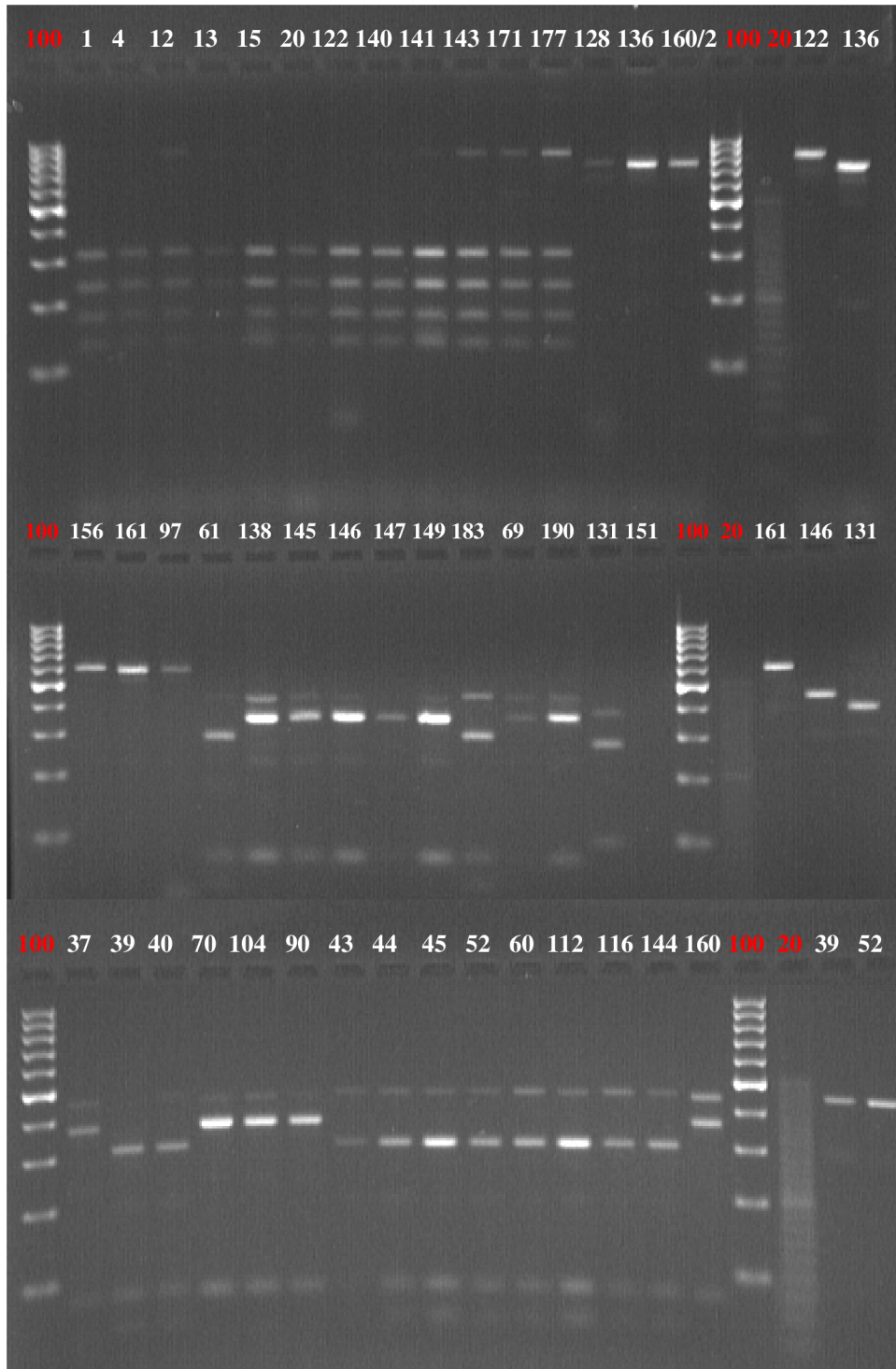
Příloha 4: Elektroforeogramy DNA kvasinek izolovaných z bobulí a moštu vinné révy po reakci PCR a restrikční analýze



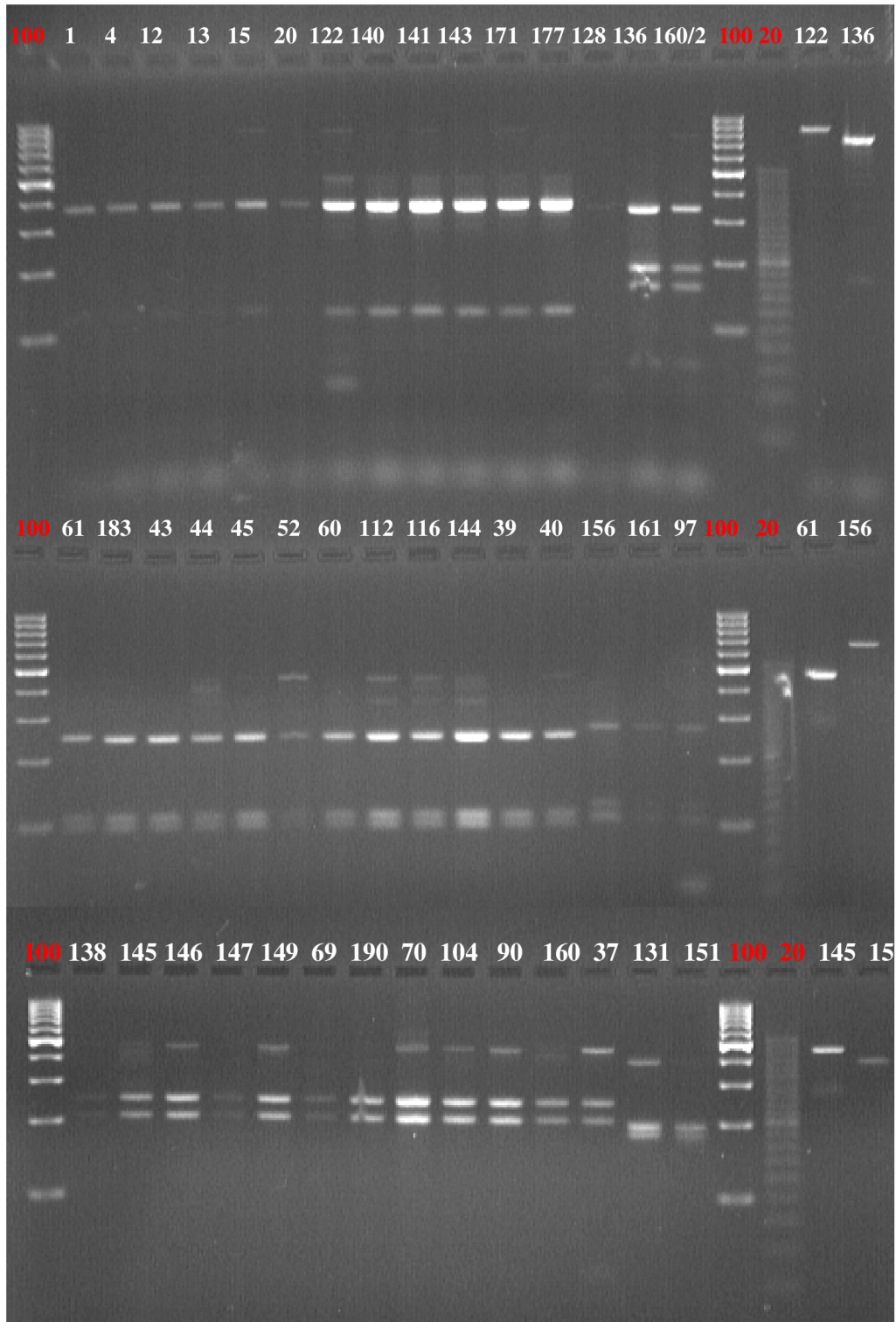
Obrázek 1: Elektroforetické rozdělení fragmentů po amplifikaci metodou PCR



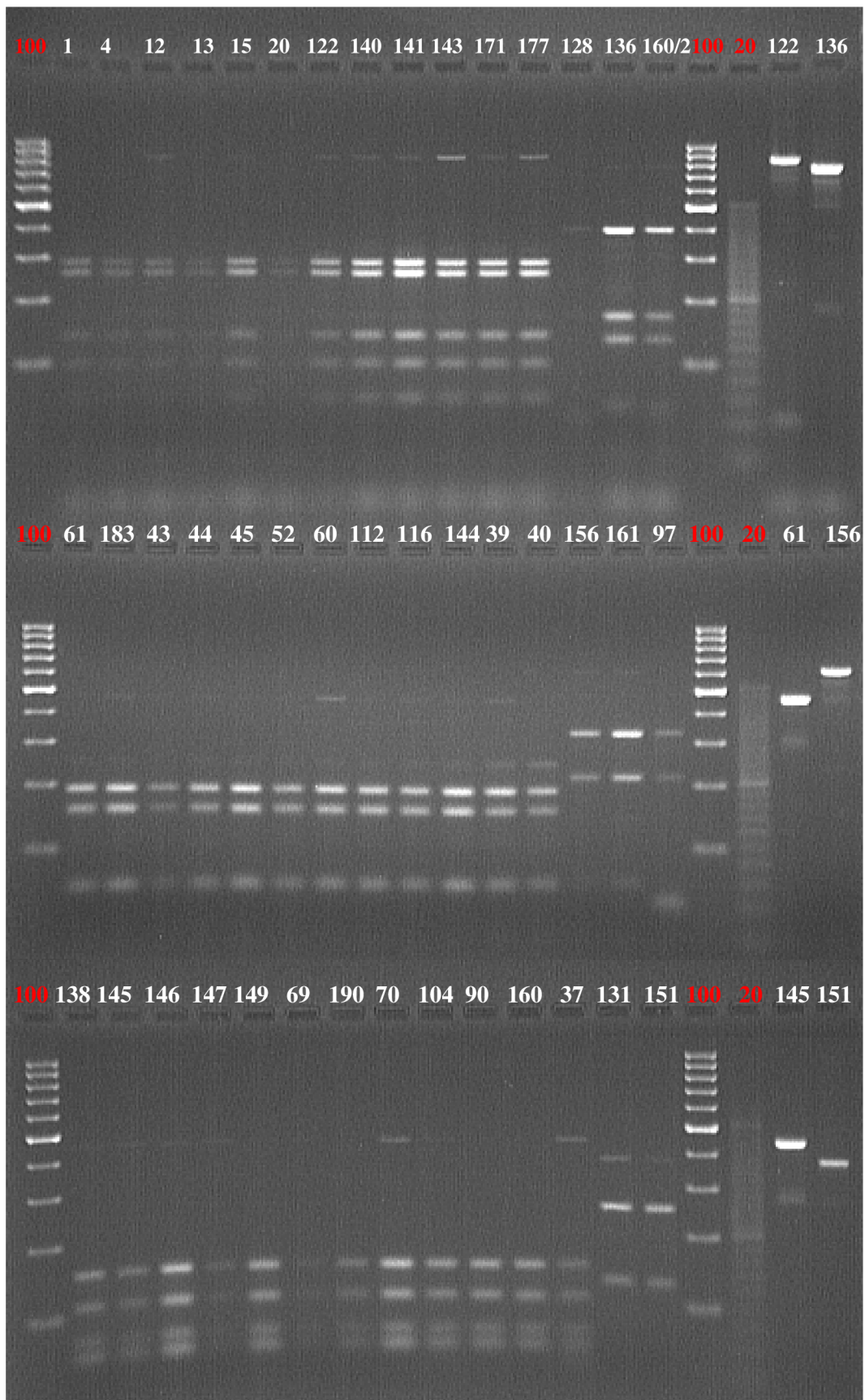
Obrázek 2: Elektroforetické rozdělení fragmentů po amplifikaci metodou PCR



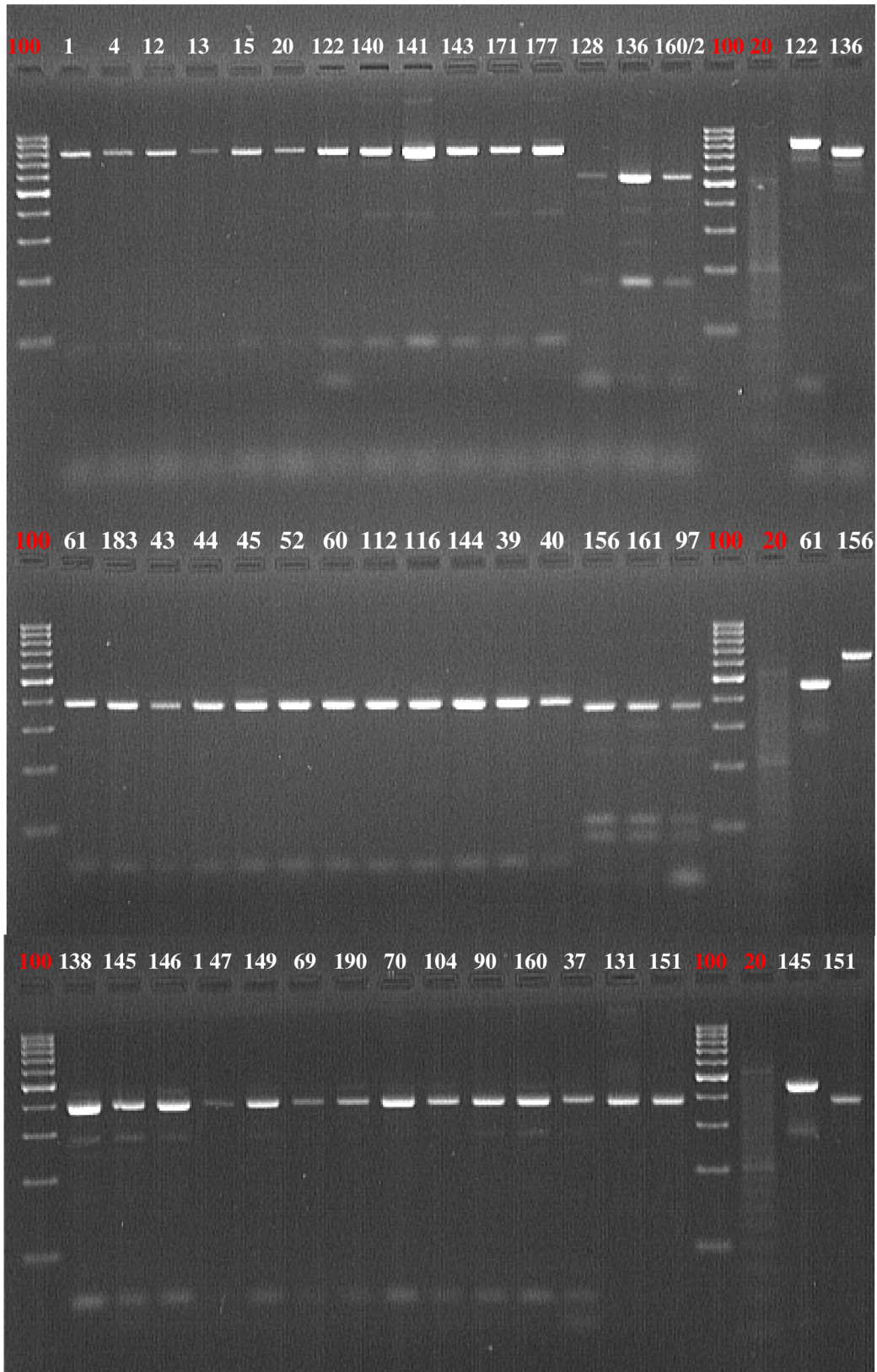
Obrázek 3: Elektroforeogramy po štěpení PCR produktů endonukleázou HaeII



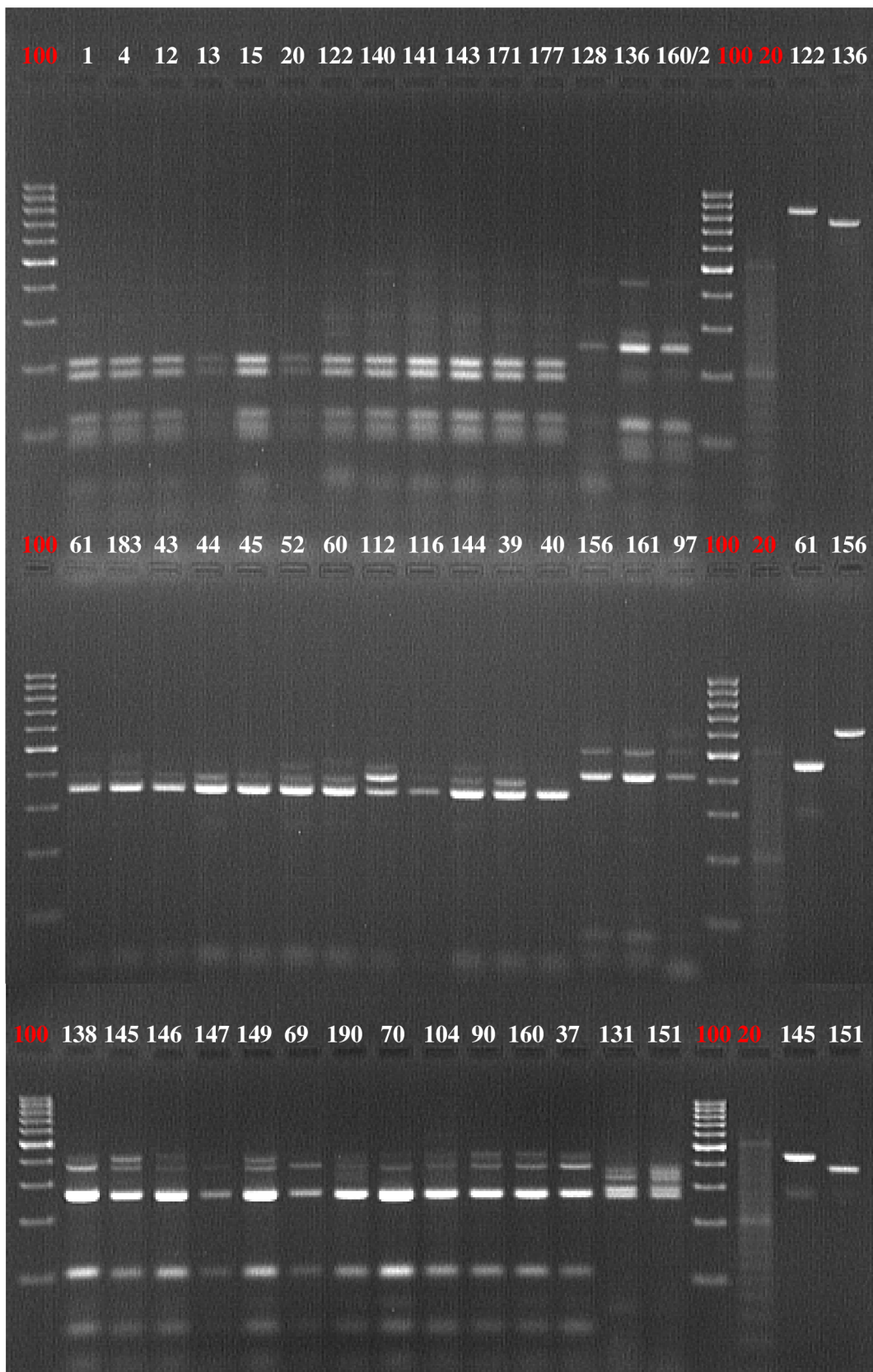
Obrázek 4: Elektroforeogramy po štěpení PCR produktů endonukleázou HinfI



Obrázek 5: Elektroforeogramy po štěpení PCR produktů endonukleázou TaqI

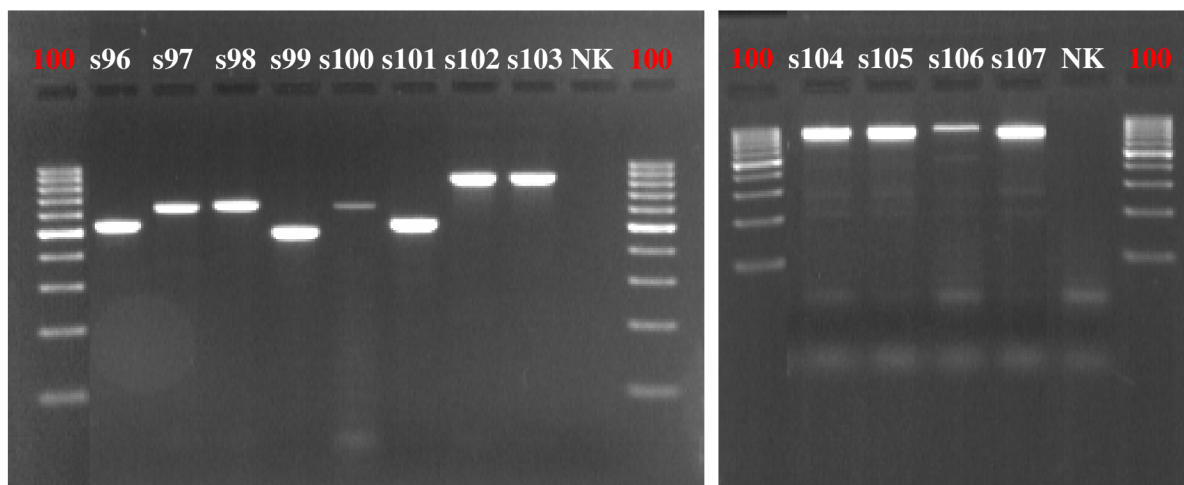


Obrázek 6: Elektroforeogramy po štěpení PCR produktů endonukleázou AluI

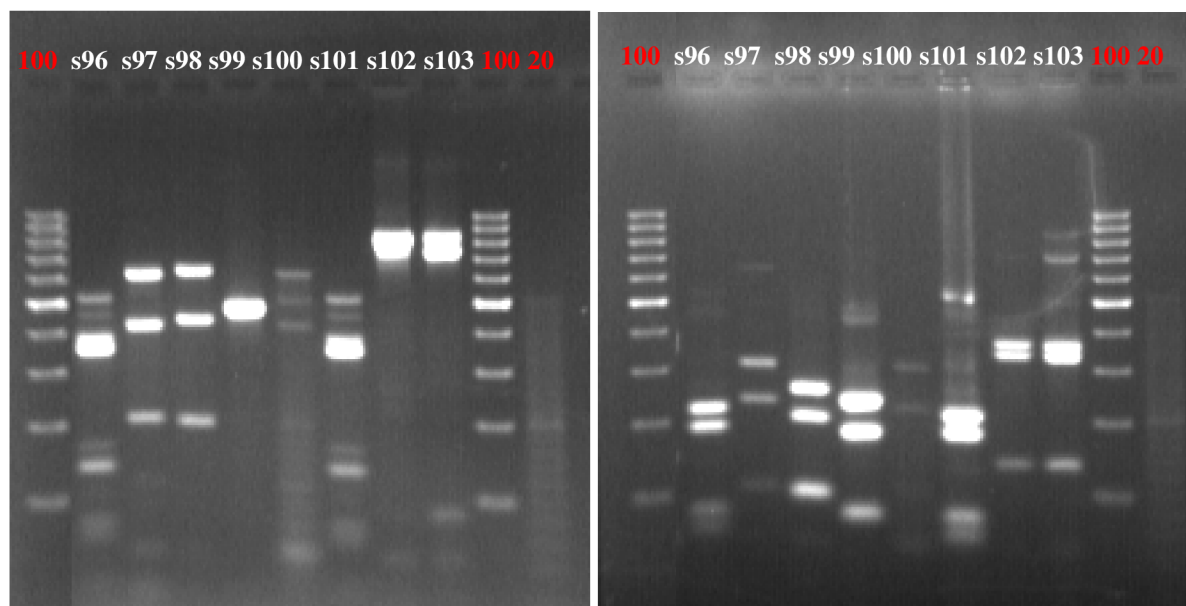


Obrázek 7: Elektroforeogramy po štěpení PCR produktů endonukleázou *MseI*

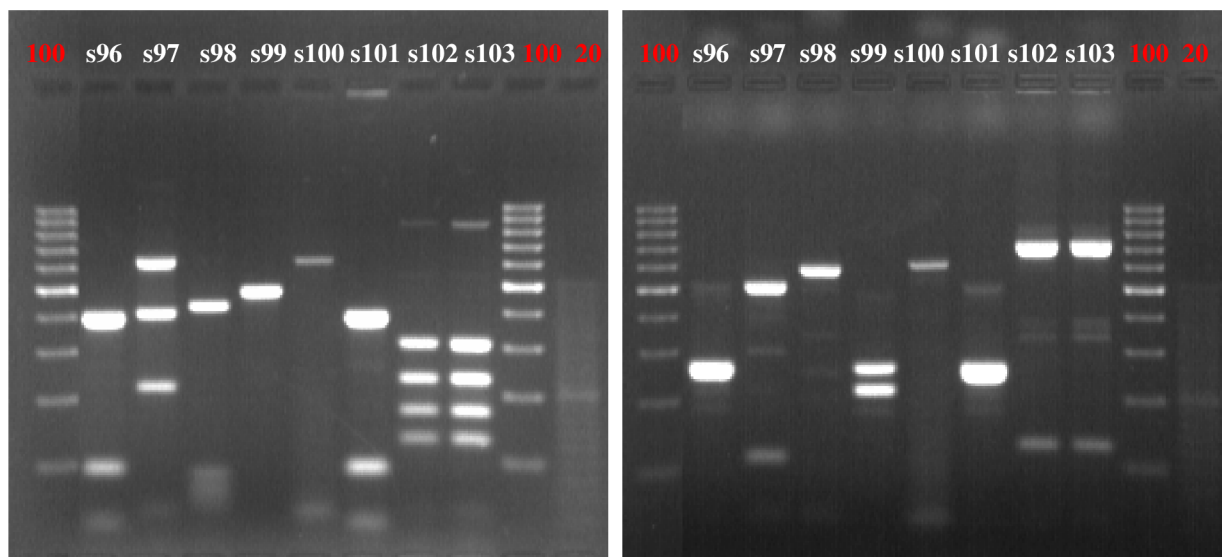
Příloha 5: Elektroforeogramy DNA typových kvasinek po reakci PCR a restrikční analýze



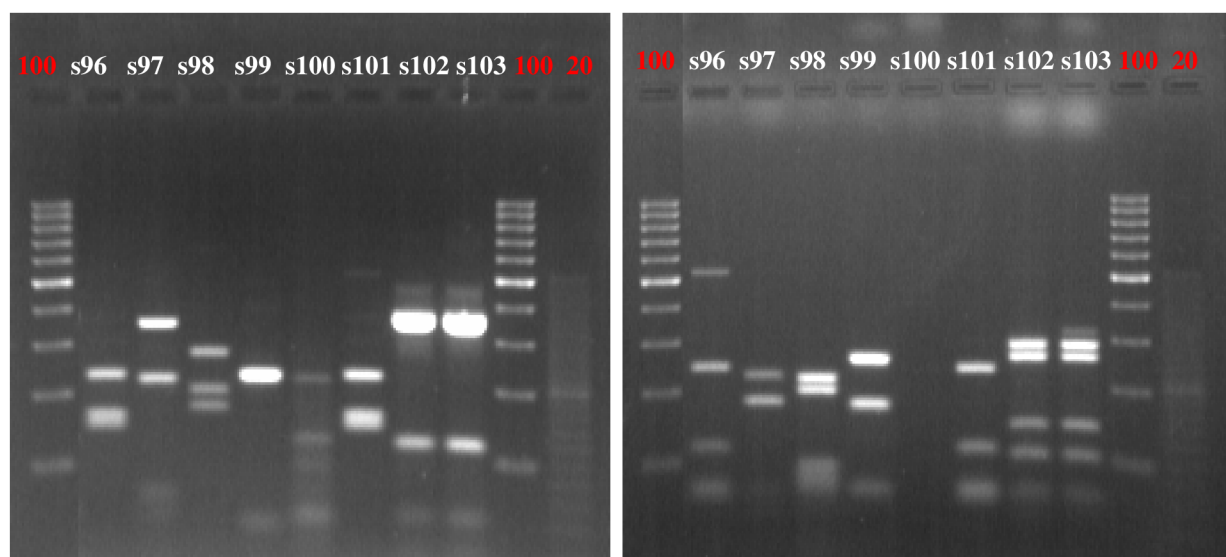
Obrázek 8: Elektroforetické rozdělení fragmentů po amplifikaci metodou PCR



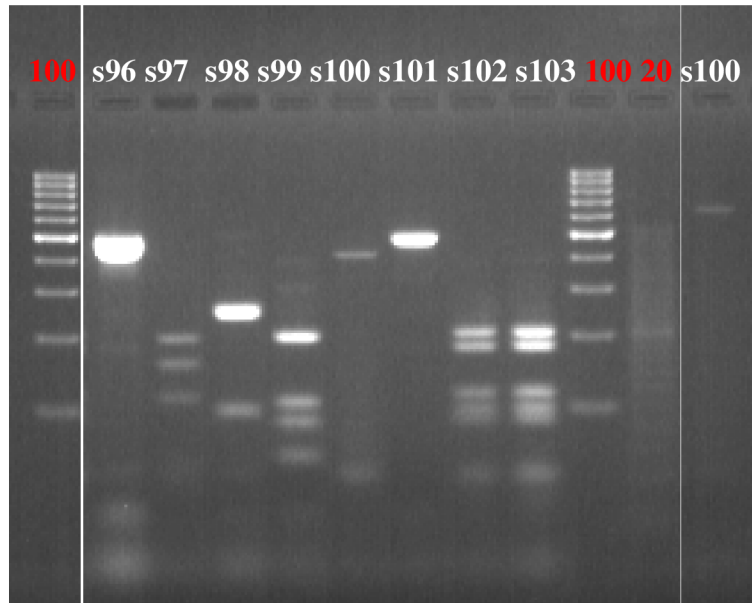
Obrázek 9: Elektroforeogramy po štěpení PCR produktů endonukleázami AluI (vlevo) a HhaI (vpravo)



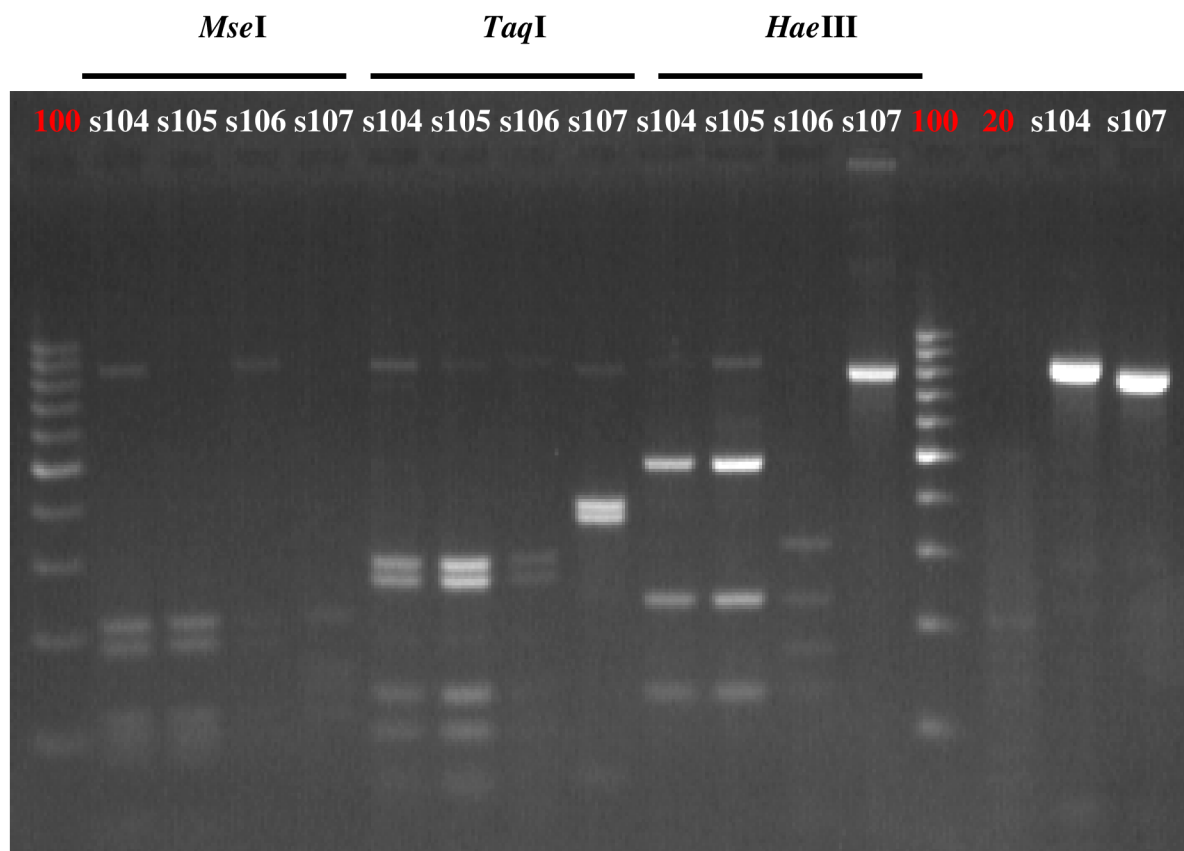
Obrázek 10: Elektroforeogramy po štěpení PCR produktů endonukleázami *HaeIII* (vlevo) a *HpaII* (vpravo)



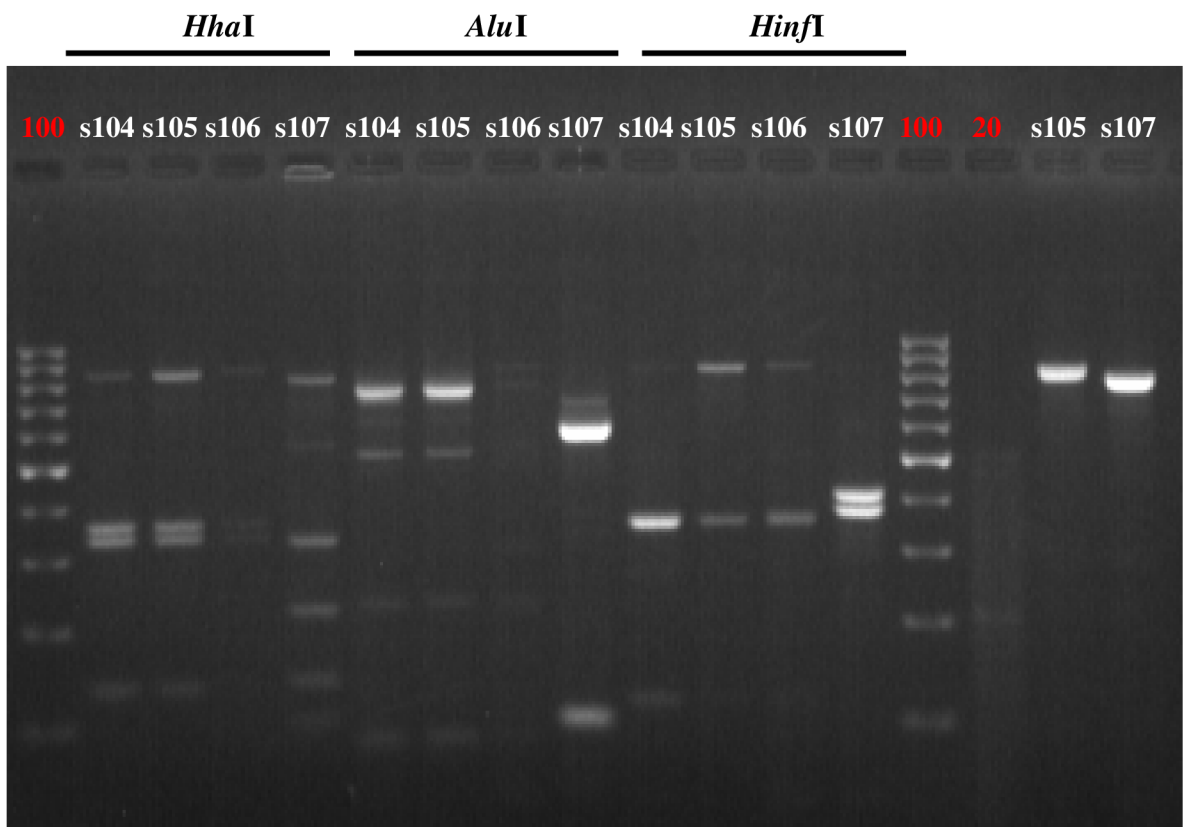
Obrázek 11: Elektroforeogramy po štěpení PCR produktů endonukleázami *HinfI* (vlevo) a *TaqI* (vpravo)



Obrázek 12: Elektroforeogram po štěpení PCR produktů endonukleázou *MseI*



Obrázek 13: Elektroforeogram po štěpení PCR produktů endonukleázami *MseI*, *TaqI*, *HaeIII*



Obrázek 14: Elektroforeogram po štěpení PCR produktů endonukleázami HhaI, AluI, HinfI